



# La protéine Core du virus de l'hépatite B est le déterminant majeur responsable de l'inhibition précoce de la réponse IFN dans les hépatocytes

Marion Gruffaz

## ► To cite this version:

Marion Gruffaz. La protéine Core du virus de l'hépatite B est le déterminant majeur responsable de l'inhibition précoce de la réponse IFN dans les hépatocytes. Virologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10090 . tel-01176008

**HAL Id: tel-01176008**

**<https://theses.hal.science/tel-01176008>**

Submitted on 13 Jul 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1  
L'ECOLE DOCTORALE BMIC

pour l'obtention du

## DIPLOME DE DOCTORAT EN BIOLOGIE

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenance publique le 4 juin 2013 par

**Marion GRUFFAZ**

**La protéine Core du virus de l'hépatite B est le déterminant majeur responsable de l'inhibition précoce de la réponse IFN dans les hépatocytes**

Directeur de thèse: Pr. Fabien ZOULIM

Co-encadrant: Dr. David DURANTEL

*Composition du Jury:*

Pr. Fabien ZOULIM

Dr. David DURANTEL

Pr. Massimo LEVRERO

Dr. Moncef BENKIRANE

Dr. François Loïc COSSET

Dr. Ivan HIRSCH

---



# **PREAMBULE**

## **I-COMPOSITION DE L'UCBL**

### **COMPOSANTE ADMINISTRATIVE**

#### **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie  
Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

#### **M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

### **COMPOSANTE SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en  
Biologie Humaine

M. le Professeur J. ETIENNE

M. le Professeur G. KIRKORIAN

M. le Professeur D. BOURGEOIS

Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

M. le Professeur Y. MATILLON

M. le Professeur P. FARGE

### **COMPOSANTE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Physique

Département Sciences de la Terre

Observatoire de Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

M. le Professeur F. De MARCHI

M. le Professeur F. FLEURY

Mme le Professeur H. PARROT

M. N. SIAUVE

M. le Professeur S. AKKOUCHE

M. le Professeur A. GOLDMAN

Mme S. FLECK

Mme la Professeure I. DANIEL

M. B. GUIDERDONI

M. G. PIGNAULT

M. C. VITON

M. R. BERNARD

Mme la Professeure V. MAUME-  
DESCHAMPS



## II-TABLE DES MATIERES

PREAMBULE.....	3
I-COMPOSITION DE L'UCBL .....	3
II-TABLE DES MATIERES.....	4
III-INDEX DES ILLUSTRATIONS .....	7
IV-ABBREVIATIONS.....	8
V-REMERCIEMENTS.....	9
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	12
I-LE VIRUS DE L'HEPATITE B.....	13
I.1 Généralités .....	13
I.1.1 La découverte du virus.....	13
I.1.2 Classification et famille des Hépadnavirus .....	14
I.1.2.1 Les orthohépadnavirus .....	14
I.1.2.2 Les avihépadnavirus.....	15
I.1.3 Les données épidémiologiques.....	15
I.1.4 Le mode de transmission .....	17
I.2 Structure et organisation génétique.....	18
I.2.1 Les particules virales, subvirales et antigéniques.....	18
I.2.2 Le génome viral.....	20
I.2.3 Les régions de régulation transcriptionnelle du génome HBV .....	21
I.2.4 Les protéines virales .....	25
I.2.4.1 Les protéines d'enveloppe.....	25
I.2.4.2 Les protéines Core et PréCore .....	27
I.2.4.3 La polymérase.....	31
I.2.4.4 La protéine X.....	32
I.2.5 Le cycle de réplication.....	34
I.2.5.1 De l'interaction du virus avec l'hépatocyte à son internalisation dans le cytoplasme.....	34
I.2.5.2 De son transport jusqu'au noyau à la formation de l'ADNccc .....	36
I.2.5.3 De la transcription de l'ARNpg à la synthèse de l'ADN RC .....	38
I.2.5.4 De la formation des nucléocapsides matures à leur sécrétion ou recyclage .....	42
I.3 Les modèles d'études du HBV.....	43
I.3.1 Les modèles acellulaires .....	43
I.3.2 Les modèles cellulaires .....	44
I.3.2.1 Les lignées d'hépatome .....	44

I.3.2.2 La lignée cellulaire HepaRG .....	46
I.3.2.3 Les hépatocytes primaires humains .....	47
I.3.3 Les modèles animaux.....	48
I.3.3.1 Les primates.....	48
I.3.3.2 Les mammifères non-primates.....	49
I.3.3.3 Le canard de pékin.....	50
I.3.3.4 La souris .....	51
II-HISTOIRE NATURELLE DE L'INFECTION PAR LE VIRUS HBV .....	54
II.1 La physiopathologie .....	54
II.1.1 L'infection aiguë.....	54
II.1.2 L'infection chronique .....	56
II.1.3 Les complications hépatiques induites par HBV .....	58
II.1.3.1 La cirrhose.....	58
II.1.3.2 Le carcinome hépatocellulaire.....	59
II.2 Les traitements des hépatites B chroniques.....	60
II.2.1 Les immunothérapies .....	61
II.2.1.1 Les immunoprophylaxies.....	61
II.2.1.2 Les traitements à base d'interféron .....	62
II.2.2 Les antiviraux .....	64
II.2.2.1 Les analogues de nucléos(t)ides .....	64
II.2.2.2 La résistance aux traitements.....	65
II.2.3 Les nouvelles stratégies antivirales .....	66
II.2.3.1 La vaccination génétique en thérapie .....	67
II.2.3.2 Une nouvelle classe d'antiviraux... ..	67
II.2.3.3 Les agonistes de PRRs .....	68
III-LA REPONSE IMMUNITAIRE DE L'HOTE ET SON INTERACTION AVEC LE VIRUS HBV .....	71
III.1 Le foie : un organe immunocompétent .....	72
III.1.1 Les hépatocytes .....	73
III.1.2 Les cellules endothéliales .....	73
III.1.3 Les cellules étoilées.....	74
III.1.4 Les cellules de Kupffer .....	74
III.1.5 Les NKs et les NKTs .....	75
III.1.6 Les cellules dendritiques.....	76
III.1.7 Les lymphocytes T CD4+, T CD8+ et Treg.....	77
III.1.7.1 Les lymphocytes T CD4+ .....	77
III.1.7.2 Les lymphocytes T CD8+ .....	77

III.1.7.3 Les lymphocytes T régulateurs .....	78
III.1.8 Les lymphocytes B.....	78
III.2 L'interaction entre HBV et la réponse immunitaire adaptative.....	79
III.2.1 Rôle des lymphocytes T CD4+ dans le contrôle de l'infection HBV .....	79
III.2.2 Rôle des lymphocytes T CD8+ dans le contrôle de l'infection HBV .....	81
III.2.3 Rôle des lymphocytes T régulateurs dans le contrôle de l'infection HBV .....	83
III.2.4 Rôle des lymphocytes B dans le contrôle de l'infection HBV .....	83
III.3 L'interaction entre le virus HBV et la réponse immunitaire innée .....	84
III.3.1 L'activation du système immunitaire innée .....	84
III.3.1.1 Le système de détection des pathogènes médié par les PRRs.....	84
III.3.1.1.1 Les Toll-Like-Receptors (TLRs) .....	84
III.3.1.1.2 Les RIG-I-Like-Receptors (RLRs).....	94
III.3.1.1.3 Les senseurs cytoplasmiques à ADN .....	96
III.3.1.1.4 L'inflammasome .....	98
III.3.1.2 Les réponses Interférons .....	101
III.3.1.2.1 Les différents types d'IFN .....	101
III.3.1.2.2 La régulation de l'expression des IFN de type I.....	103
III.3.1.2.3 La réponse antivirale .....	106
III.3.2 L'interaction entre HBV et le système immunitaire innée .....	108
III.3.2.1 HBV : un virus invisible pour le système immunitaire inné ? .....	108
III.3.2.2 HBV : un virus particulièrement efficace pour inhiber les réponses immunes de l'hôte.....	110
III.3.2.2.1 Inhibition de la réponse IFN dans les hépatocytes.....	110
III.3.2.2.2 Inhibition des fonctions des cellules immunitaires innées .....	111
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE .....	115
Etude 1 .....	121
Etude 2 .....	123
Etude 3 .....	125
DISCUSSION .....	127
I-DISCUSSION DE L'ETUDE 1 .....	127
II-DISCUSSION DE L'ETUDE 2 .....	128
III-DISCUSSION DE L'ETUDE 3 .....	132
IV-PERSPECTIVES.....	137
BIBLIOGRAPHIE.....	143
RESUME DE LA THESE.....	185

# III-INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Observation d'un inoculum HBV en microscopie électronique à transmission (Dane, Cameron et al. 1970).....	13
Figure 2 : Distribution géographique des quasi espèces virales dans le monde .....	15
Figure 3 : Distribution géographique de la prévalence de l'antigène HBs en 2005 (adaptée de Sevant-Delmas et al. 2007) .....	16
Figure 4 : Les différents composants viraux d'un inoculum HBV sécrétés par les hépatocytes infectés, et leur composition protéique.....	19
Figure 5 : Organisation génétique du virus HBV .....	20
Figure 6 : Les différents transcrits viraux .....	22
Figure 7 : Les trois protéines d'enveloppe du HBV (S, M et L).....	26
Figure 8 : La double topologie de la protéine L.....	27
Figure 9 : Les protéines Core et Précore du HBV .....	30
Figure 10 : Les différents domaines de la polymérase du HBV.....	31
Figure 11 : Le cycle de réplication du HBV .....	36
Figure 12 : Transport de la nucléocapside et délivrance du génome HBV au noyau .....	38
Figure 13 : Retro-transcription de l'ARN prégénomique et synthèse de l'ADN RC .....	41
Figure 14 : Observation microscopique de cellules d'hépatome HuH7 et HepG2 (microscope optique).....	44
Figure 15 : Observation microscopique de la différenciation des cellules HepaRG (microscope optique).....	47
Figure 16 : Observation microscopique d'hépatocytes primaires humains <i>in vitro</i> (microscope optique).....	47
Figure 17 : Les différents modèles animaux susceptibles à l'infection par les Hepadnaviridae.....	48
Figure 18 : Principe de la greffe hépatocytaire au sein du modèle murin FRG .....	53
Figure 19 : L'hépatite B aiguë (Deny and Zoulim 2010) .....	55
Figure 20 : L'hépatite B chronique (Deny and Zoulim 2010) .....	56
Figure 21 : Mode d'action des analogues de nucléos(t)ides : étapes du cycle viral ciblées et conséquences sur la réplication du virus HBV .....	64
Figure 22 : Activation du système immunitaire suite à la détection d'un pathogène.....	72
Figure 23 : Répartition des différentes populations cellulaires dans le foie humain (adaptée de Dong et al. 2007) .....	73
Figure 24 : Organisation structurale d'un TLR.....	85
Figure 25 : Distribution cellulaire et spécificité de reconnaissance des TLRs.....	87
Figure 26 : Les voies de signalisation médiées par les TLRs (adaptée de Thompson et al. 2011) .....	93
Figure 27 : Les senseurs cytoplasmiques et nucléaires (adaptée de Thompson et al. 2011) .....	100
Figure 28 : Mécanisme d'activation transcriptionnelle du gène IFN- $\beta$ .....	105
Figure 29 : La voie de signalisation JAK/STAT .....	106
Figure 30: Corrélation entre localisation cellulaire de la protéine HBc et la réponse immunitaire (adaptée de Papatheodoridis 2008 et Akiba 1987) .....	134
Figure 31 : Nouveau concept d'inhibition précoce des réponses IFN médiée par la protéine HBc au niveau épigénétique.....	137
Figure 32 : Inhibition précoce des réponses IFN induite par la protéine de capsid dans le microenvironnement hépatique .....	139

## IV-ABBREVIATIONS

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNccc	ADN covalent clos circulaire superenroulé
ADN L	ADN linéaire
ADN RC	ADN relâché circulaire
ADN sb	ADN simple brin
ADN db	ADN double brins
AgHBc	Antigène de capside du HBV
AgHBe	Antigène e du HBV
AgHBs	Antigène de surface du HBV
ALAT	Alanine amino transaminases
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNpg	Acide ribonucléique prégénomique
BCP	Promoteur basal Core
CHB	Hépatite B chronique
CHC	Carcinome hépatocellulaire
db	Double brins
DCs	Cellules dendritiques
DHBV	Virus de l'hépatite B du canard
ε	Signal d'encapsidation
HBV	Virus de l'hépatite B humain
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ISG	Gène induit par l'IFN
kDa	Kilodalton
KCs	Cellules de Kupffer
LSECs	Cellules endothéliales
NKs	Cellules dites « natural killer »
NPC	Cellules non parenchymales
nt	Nucléotide
ODN	Oligodésoxynucléotide
ORF	Cadre ouvert de lecture
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
pb	Paire de base
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
PRR	Pathogen recognition receptor
RE	Reticulum endoplasmique
RLR	RIG-I like receptor
RNaseH	Ribonucléase H
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT	Transcriptase inverse
sb	Simple brin
TLR	Toll like receptor
WHV	Virus de l'hépatite B de la marmotte

# V-REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier tous les membres de mon jury qui ont pris le temps d'étudier mon travail et d'assister à ma soutenance. Tout d'abord, un grand merci au **Pr. Massimo Levrero** et au **Dr. Monsef Benkirane** qui ont accepté d'être rapporteur de ma thèse et d'étudier ainsi de façon critique mon manuscrit. Je remercie également le **Dr. Ivan Hirsch** qui, en tant qu'examinateur, a également pu participer à la discussion scientifique lors de ma soutenance, sous la direction du **Dr. François Loïc Cosset** qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.

Je souhaite bien sûr remercier le **Pr. Fabien Zoulim** qui m'a accueilli dans son laboratoire et ainsi donné l'opportunité d'effectuer ce travail de thèse. Merci pour votre confiance, votre écoute ainsi que pour votre sympathie. Je tiens également à vous adresser mon profond respect pour le travail que vous accomplissez chaque jour en tant que directeur de l'unité INSERM U1052, et qui permet au laboratoire de conserver son excellence et sa renommée internationale dans le domaine des hépatites virales.

L'équipe « Innate Immunity » n'aurait pas pu devenir ce qu'elle est aujourd'hui, et les résultats obtenus pendant ces quatre années de thèse n'auraient pas pu être ce qu'ils sont sans le coaching du **Dr. David Durantel** que je tiens tout particulièrement à remercier. Un immense merci à toi David pour l'apprentissage et la formation par (et pour) la recherche que tu m'as donnée. De par ton flux d'idées constants et ton enthousiasme, tu as su mener les troupes « Innate Immunity » et faire aboutir des projets naissants dans cette nouvelle thématique au sein du laboratoire. J'espère un jour pouvoir arriver à ton niveau d'excellence. Plus personnellement, merci pour avoir su me remotiver pendant les moments difficiles qui, pour te citer, sont nécessaires pendant une thèse pour pouvoir à nouveau sortir la tête de l'eau ! Merci pour ta joie de vivre et ta disponibilité, et j'espère que tu garderas encore longtemps la flamme de chercheur qui t'anime...

Pendant cette thèse, j'ai également pu évoluer au sein d'une équipe de « Hit Girls » à qui je dois également beaucoup ! Je tiens ainsi à remercier toutes les filles de l'équipe « Innate Immunity » : **Souphalone, Malika, Barbara, Nathalie et Dulce**. Souphalone, les mots me manquent pour t'exprimer toute ma gratitude. Tu as toujours été un pilier pour moi autant professionnellement que personnellement, et je te remercie infiniment pour la confiance que tu as eu en moi, quand moi-même je n'y croyais pas ! Malika, un grand merci à toi pour m'avoir pris sous ton aile pendant mes débuts au laboratoire et pour avoir amené du « pep's » au laboratoire ! Barbara (ou Miss « CHIP »), merci pour avoir ramené d'Italie ton expertise au labo, qui a été indispensable à mon projet de thèse et qui participent à l'originalité de ces travaux. Nathalie et Dulce... Merci pour tous les petits coups de main que vous m'avez donné, des extractions d'ADN aux transductions de lignées en passant par les cinétiques à arrêter le week end ! Thanks +++ Girls !

Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai pu croiser pendant ces 4 années de thèse, et avec qui j'ai parfois pu travailler : Merci **Maud, Lydie et Judith** pour vos préparations de PHH indispensables au laboratoire ! Merci à tous les « Annexiens » (**Anaïs, Maelenn, Charlène...**) pour donner de la « fraîcheur » au labo ! Et Merci également à ceux

qui sont partis avant moi (**Ghada, Hayate, Gaetan, Xavier** et **Fabien A.**) mais qui m'ont permis de passer de très bons moments au CAT, et qui me laissent de très bons souvenirs ! Merci également à **Marc** pour toutes les discussions sur TLR3 et à **Floriane** pour m'avoir fait entrevoir le monde des souris.

Finalement, une grande pensée pour mes parents **Gilles** et **Marie Paule**, ma sœur **Audrey** et ma cousine **Marine** pour m'avoir fait confiance et m'avoir toujours soutenue dans mes choix professionnels ! Je tiens également à remercier **Charlotte, Tomic, Aurélie** et **Morganne** qui m'ont entourées pendant ces années de thèse et qui ont toujours été là pour moi !

PS : Merci SL ;)







# **DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **I-LE VIRUS DE L'HEPATITE B**

### **I.1 Généralités**

#### ***I.1.1 La découverte du virus***

Des symptômes de jaunisse et des épidémies d'ictères associées à des syndromes fébriles d'aspect grippal sont connus depuis l'Antiquité, même si leurs diagnostics rétrospectifs restent à l'heure actuelle incertains. A la fin du 18ème siècle, la notion d'hépatite épidémique fut abordée par Martin Lange puis, grâce aux avancées médicales et à la naissance de la microbiologie, Lürmann précisa l'origine infectieuse de cette maladie en 1885. Plus tard, à la suite de la Première Guerre Mondiale, les données épidémiologiques recueillies ont permis d'identifier deux types distincts d'hépatite ; ainsi l'hépatite A et l'hépatite B se distinguèrent grâce à leur période d'incubation, respectivement courte et longue (Maccallum 1946). En 1963, Baruch Blumberg découvrit finalement l'Antigène Australia, premier marqueur sérique permettant de distinguer l'hépatite B d'autres affections hépatiques, et aujourd'hui appelé communément antigène HBs (AgHBs) (Blumberg and Riddell 1963; Blumberg, Alter et al. 1965; Blumberg 2002). La première visualisation de la particule virale fut réalisée par David Dane en 1970 grâce aux techniques de microscopie électronique, et ceci à partir des *sera* de patients (figure 1) (Dane, Cameron et al. 1970). Depuis ce jour, d'autres virus hépatotropes ont été découverts incluant les virus des hépatites C, D, E, F et G (Bradley, Krawczynski et al. 1987; Choo, Kuo et al. 1989; Deka, Sharma et al. 1994; Simons, Leary et al. 1995; Rizzetto 2009).

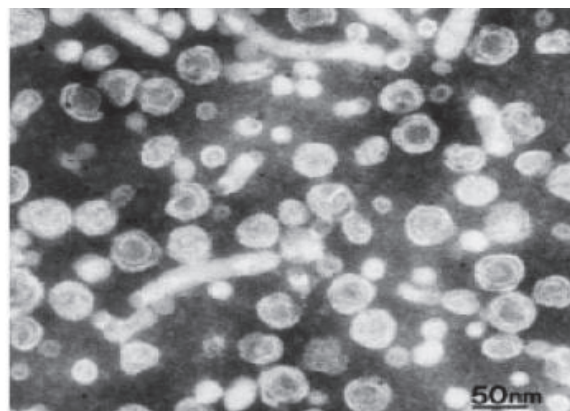


FIGURE 1 : OBSERVATION D'UN INOCULUM HBV EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (DANE, CAMERON ET AL. 1970)

## ***1.1.2 Classification et famille des Hépadnavirus***

Le virus de l'hépatite B appartient à la famille des hépadnavirus ou *Hepadnaviridae* (pour « Hepatotropic DNA Virus ») du groupe VII (virus à ADN double brins à intermédiaire ARN) selon la classification de Baltimore. Tous les hépadnavirus ont en commun leur tropisme essentiellement hépatique, leur organisation génétique, leur morphologie virale et leur mode de réplication incluant une étape de rétrotranscription. Selon l'espèce d'hôte, on peut diviser cette famille en deux genres : les *orthohépadnavirus* et les *avihépadnavirus* dont le HBV et le DHBV (pour « Duck Hepatitis B Virus ») sont respectivement les principaux membres (Schaefer 2007).

### ***1.1.2.1 Les orthohépadnavirus***

Les *orthohépadnavirus* sont représentés essentiellement par le virus de l'hépatite B humain mais aussi par des virus phylogénétiquement proches du HBV infectant des primates supérieurs comme le chimpanzé, l'orang-outan, le gibbon... ou encore des rongeurs comme l'écureuil fouisseur et la marmotte. Ces mammifères, primates ou non, peuvent également être susceptibles à l'infection par HBV comme décrit dans la partie « Modèles d'études du HBV » de ce manuscrit de thèse.

La classification des souches du HBV a tout d'abord été réalisée par sérotypage à partir d'un panel d'anti-séras standardisés dirigés contre les épitopes de l'AgHBs (Courouche 1976). A l'heure actuelle, grâce au progrès du séquençage, les différents isolats sont classifiés par génotypage d'une région présente dans le gène S de l'enveloppe (Okamoto, Tsuda et al. 1988; Ohba, Mizokami et al. 1995). Un génotype est reconnu comme nouveau lorsque 8% de sa séquence virale varie avec les génotypes déjà circulants. Il existe actuellement 10 génotypes notés A à J, chacun étant associé à une virulence et à un pronostic clinique différent (Kim, Revill et al. 2011). En effet, le génotype A est retrouvé en Europe du Nord, en Amérique du Nord et en Afrique australe. Les génotypes B, C, I et J sont principalement retrouvés en Asie du Sud-Est, en Chine ou au Japon. Le génotype D est prépondérant dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Inde alors que le génotype E est retrouvé principalement en Afrique centrale. Finalement, les génotypes F et G sont distribués en Amérique centrale et en Amérique du Sud tandis que le génotype H est confiné au niveau de l'Amérique centrale (figure 2) (Kramvis, Kew et al. 2005; Kay and Zoulim 2007; Kao 2011; Lin and Kao 2011).

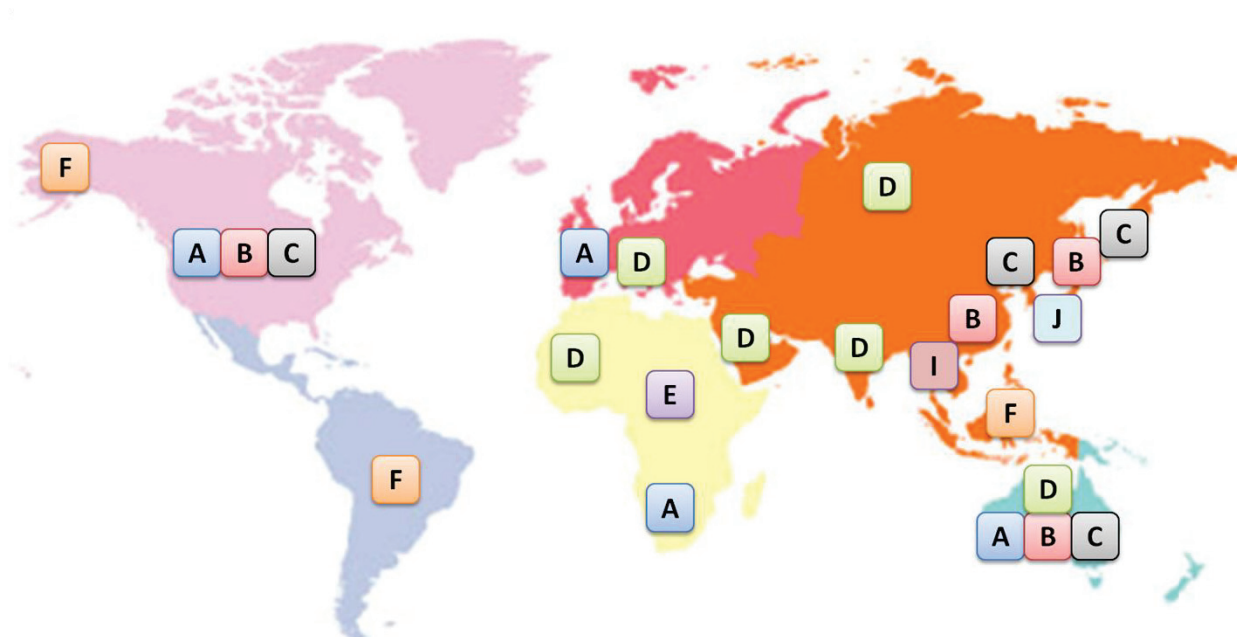


FIGURE 2 : DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES QUASI ESPECES (GENOTYPES) DU VIRUS HBV DANS LE MONDE

### *1.1.2.2 Les avihépadnavirus*

Le prototype des *avihépadnavirus* (ou hépadnavirus aviaires) est le DHBV infectant le canard de Pékin qui, est à l'heure actuelle, est souvent utilisé comme modèle expérimental pour l'étude de la biologie du HBV (cf. partie « Modèles d'études du HBV »). Ce genre comprend également le STHBV (pour « Stork Hepatitis B Virus ») retrouvé chez la cigogne blanche (Pult, Netter et al. 2001), le HHBV (pour « Heron Hepatitis B Virus ») retrouvé chez le héron gris, le RGHBV et le SGHBV (pour « Ross Goose Hepatitis B Virus » et « Snow Goose Hepatitis B Virus » respectivement) spécifiques de l'oie (Chang, Netter et al. 1999), et finalement le CHV (pour « Crane Hepatitis Virus ») qui infecte la grue (Prassolov, Hohenberg et al. 2003).

### *1.1.3 Les données épidémiologiques*

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2012), deux milliards de personnes sur la planète ont été en contact avec le virus de l'hépatite B à un moment donné de leur vie, et suite à cette rencontre 350 millions seraient ainsi devenus porteurs chroniques, soit ~5% de la population mondiale (Marcellin 2009). En France, plus particulièrement, on considère que 3 millions de personnes ont rencontré le virus au cours de leur vie, et que 280 000 individus auraient ainsi développé une hépatite chronique, même si ce chiffre pourrait être sous-estimé du fait du caractère asymptomatique de la maladie (Antona, Couturier et al. 2011).

Ces données épidémiologiques font de l'infection par le virus de l'hépatite B un réel problème de Santé Publique, avec pour conséquences la survenue *in fine* d'une cirrhose et/ou d'un carcinome hépatocellulaire (Lavanchy 2004; El-Serag 2012). Cette forte prévalence du virus de l'hépatite B permet la continuité de la transmission virale grâce à l'important réservoir humain constitué par les porteurs chroniques. Il faut cependant noter que toutes les régions du globe ne sont pas égales face à cette épidémie (OMS, 2012). En effet, la prévalence est inversement proportionnelle à la situation sociale et économique du pays. Ainsi, la distribution mondiale de la prévalence du portage de l'AgHBs chez l'adulte a pu mettre en relief trois types de région (figure 3) :

- Une zone de faible endémie (<2% d'AgHBs) : Europe de l'Ouest, Australie et Amérique du Nord et certains pays d'Amérique latine ;
- Une zone de moyenne endémie (2 à 7% d'AgHBs) : Europe de l'Est, Proche-Orient, pays méditerranéens, Asie du Sud-Est, Russie et certains pays d'Amérique du Sud;
- Une zone de haute endémie (8 à 20% d'AgHBs) : Afrique Sub-saharienne, Chine et certains pays de l'Europe de l'Est, d'Amérique du Sud et d'Amérique du Nord.

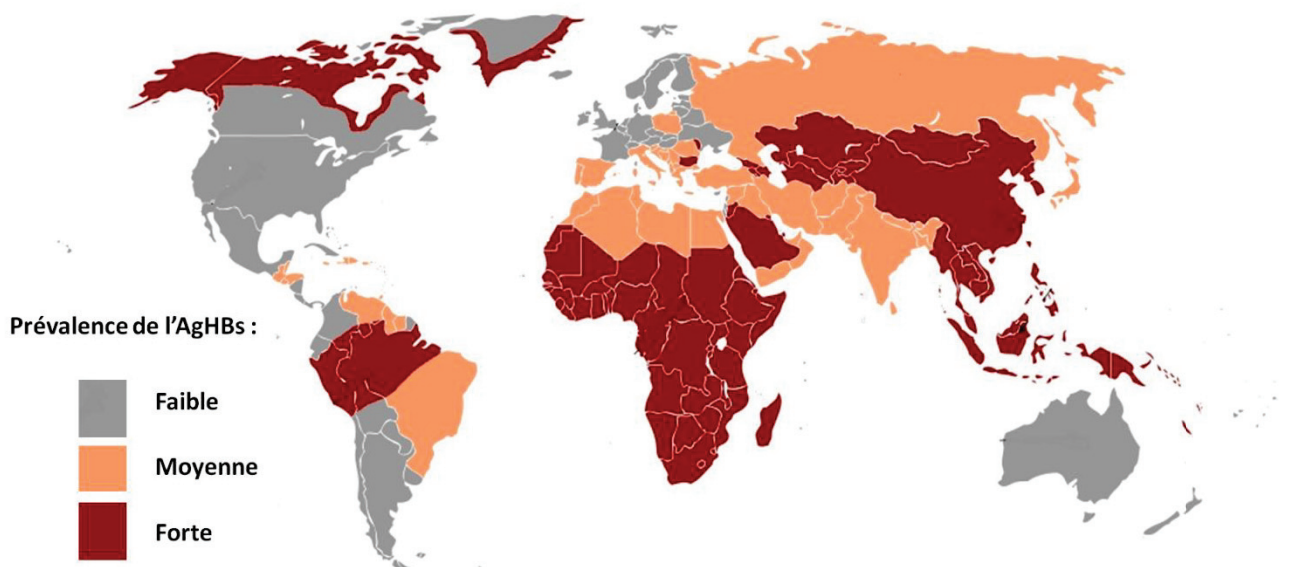


FIGURE 3 : DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DE LA PREVALENCE DE L'ANTIGENE HBS EN 2005 (ADAPTEE DE SEVANT-DELMAS ET AL. 2007)

Seule une contamination dans la période périnatale ou pendant la petite enfance peut expliquer les taux de portage élevés dans les pays de forte endémie, avec des infections évoluant très fréquemment vers la chronicité. Dans les pays de faible endémie, la plupart des infections surviennent à l'âge adulte ce qui explique le faible pourcentage de porteur chronique. Tout comme l'incidence ou la prévalence, le mode de transmission dépend également du statut socio-économique du pays.

### ***1.1.4 Le mode de transmission***

Chez un sujet infecté, le virus de l'hépatite B est présent dans de nombreux liquides ou sécrétions ce qui introduit la notion de réservoir viral. Tout d'abord le sang constitue le plus important réservoir avec des charges pouvant atteindre  $10^9$  équivalent génome/ml (veg/ml) chez certains patients. De façon moindre, le virus HBV est aussi présent dans les sécrétions sexuelles (ratio  $\sim 1/1000$  par rapport au sang) ainsi que dans d'autres liquides biologiques tels la salive, les larmes, les urines et les selles (Kidd-Ljunggren, Holmberg et al. 2006). Conséquence directe de la distribution du virus dans l'organisme, quatre modes distincts de transmission peuvent être défini (OMS, 2012):

- La transmission horizontale parentérale (sang) : en plus des contaminations possibles lors d'actes médicaux tels que la transfusion sanguine et la greffe, des comportements à risques facilitent la transmission du virus d'un individu à l'autre. En effet, des actes de toxicomanie, de tatouage ou de percings avec utilisation de matériels souillés peuvent également être à l'origine de la transmission du virus (Kane, Lloyd et al. 1999). Ainsi, dans les pays de faible endémie, la transmission parentérale par manquement aux règles prophylactiques est la plus fréquente (Lavanchy 2004).
- La transmission horizontale sexuelle : l'hépatite B peut être classiquement assimilée à une infection sexuellement transmissible (IST). Elle peut se contracter lors de rapports intimes hétérosexuels ou homosexuels masculins non protégés. La transmission vénérienne constitue un mode majeur et croissant de transmission dans les pays développés (OMS, 2012).
- La transmission horizontale de contact : le virus de l'hépatite B peut être transmis lors de contacts rapprochés non sexuels mais fréquents avec une personne contaminée. Ce mode de transmission, au sein de collectivités ou intrafamiliale, peut résulter du contact entre de petites lésions cutanées, de la salive... En effet, la cohabitation avec un individu porteur chronique du HBV favorise la transmission virale (Petersen, Barrett et al. 1976). Plus particulièrement, 75% des conjoints de porteurs chroniques présentent un marqueur sérique HBV (Lobato, Tavares-Neto et al. 2006). Ainsi, la vaccination de l'entourage d'un individu contaminé par HBV est vivement encouragée.
- La transmission verticale : cette dissémination de la mère à l'enfant est le mode de transmission le plus couramment retrouvé dans les pays de forte endémie. Elle conduit à l'établissement d'une hépatite chronique dans 90% des cas (Lai and Yuen 2007). Il existe trois voies distinctes : la transmission *in utero* par le sang, la

transmission périnatale lors de l'accouchement et la transmission postnatale lors de l'allaitement (Giles, Visvanathan et al. 2012). Dans les pays de faible endémie, pour pallier à ce risque, un dépistage systématique est proposé aux femmes enceintes ainsi qu'une vaccination des nouveau-nés dans le cas des mères porteuses du virus HBV (Lee, Young et al. 2002).

## I.2 Structure et organisation génétique

### I.2.1 Les particules virales, subvirales et antigéniques

En plus des « particules de Dane » qui portent le caractère infectieux du virus de l'hépatite B, d'autres composants viraux tels que les particules subvirales et l'AgHBe soluble peuvent être retrouvées dans les *sera* des patients infectés (figure 4).

En effet, en plus des particules infectieuses, il existe des particules subvirales sphériques (environ 20nm de diamètre) et filamenteuses (22nm de large pour une longueur variable) (Gilbert, Beales et al. 2005; Patient, Hourieux et al. 2009). Ces particules sont en surnombre (environ 1000 à 10000 fois plus nombreuses) par rapport aux virions infectieux dans les *sera* des patients (Ganem and Prince 2004). Celles-ci sont dépourvues d'ADN viral et sont donc non infectieuses. L'enveloppe des particules infectieuses du virus HBV est composé de 3 protéines : S, M et L. La protéine S est la plus abondante et la protéine L est minoritaire (cf. partie « Les protéines d'enveloppe »). Les particules sphériques sont majoritairement constituées de protéines d'enveloppe S et, dans une moindre mesure, elles contiennent également la protéine M. Dans les particules filamenteuses, la protéine L pourrait également être faiblement détectée. (Heermann, Goldmann et al. 1984). La variation dans leur topologie structurale pourrait ainsi être dépendante du ratio S/L et de la quantité de protéines L incorporée pendant la morphogénèse. Cependant, une quantité trop importante de protéines L incorporée dans les particules subvirales tend à inhiber leur sécrétion et favorise leur rétention dans le cytoplasme (Persing, Varmus et al. 1986). Cette accumulation de protéines d'enveloppe dans le cytoplasme des cellules infectées peut avoir un effet toxique pouvant entraîner la mort de l'hépatocyte (Roingeard and Sureau 1998). Les particules subvirales seraient le résultat de l'auto-assemblage des protéines d'enveloppe dans l'espace péri-nucléaire qui serait pris en charge par le RE avant d'être sécrété par bourgeonnement au niveau de la membrane cytoplasmique. Leur rôle est encore incertain ; elles pourraient jouer un rôle de leurre immunologique en neutralisant les anticorps dirigés contre l'AgHBs et ainsi participer à la dissémination et à la persistance de l'infection (Bruss



2007; Patient, Hourieux et al. 2009). Mais comme nous le verrons plus tard, elles peuvent également avoir d'autres rôles immunomodulateurs.

L'antigène HBe, retrouvé en abondance dans le sérum des patients, ne semble pas non plus être impliqué dans le cycle de réplication du virus et n'est pas requis pour l'infection. Il pourrait également avoir un effet tolérigène en participant à l'anergie des lymphocytes T spécifiques de l'antigène HBc et contribuer ainsi à la persistance de l'infection (Milich and Liang 2003; Walsh and Locarnini 2012).

De plus, il a également été démontré que des nucléocapsides non enveloppées pouvaient être sécrétées dans le surnageant de lignées d'hépatome après transfection par un plasmide codant pour le génome HBV (Gerelsaikhan, Tavis et al. 1996; Watanabe, Sorensen et al. 2007; Wittkop, Schwarz et al. 2010). Il semblerait que les voies de sécrétion empruntées par les particules de Dane et les nucléocapsides non enveloppées soient différentes (Bardens, Doring et al. 2011). Il a ainsi été proposé la mise en place de mécanismes d'autophagie et/ou d'exocytose comme précédemment observés dans d'autres familles virales (Jackson, Giddings et al. 2005). Par ailleurs, il a également été démontré que ces nucléocapsides non enveloppées pouvaient à nouveau pénétrer dans les hépatocytes par endocytose clathrine-dépendante et ainsi participer à la propagation de l'infection (Vanlandschoot, Van Houtte et al. 2005; Cooper and Shaul 2006). Leur présence dans le sérum des patients n'a cependant pas encore été démontré de manière irréfutable (Possehl, Repp et al. 1992).

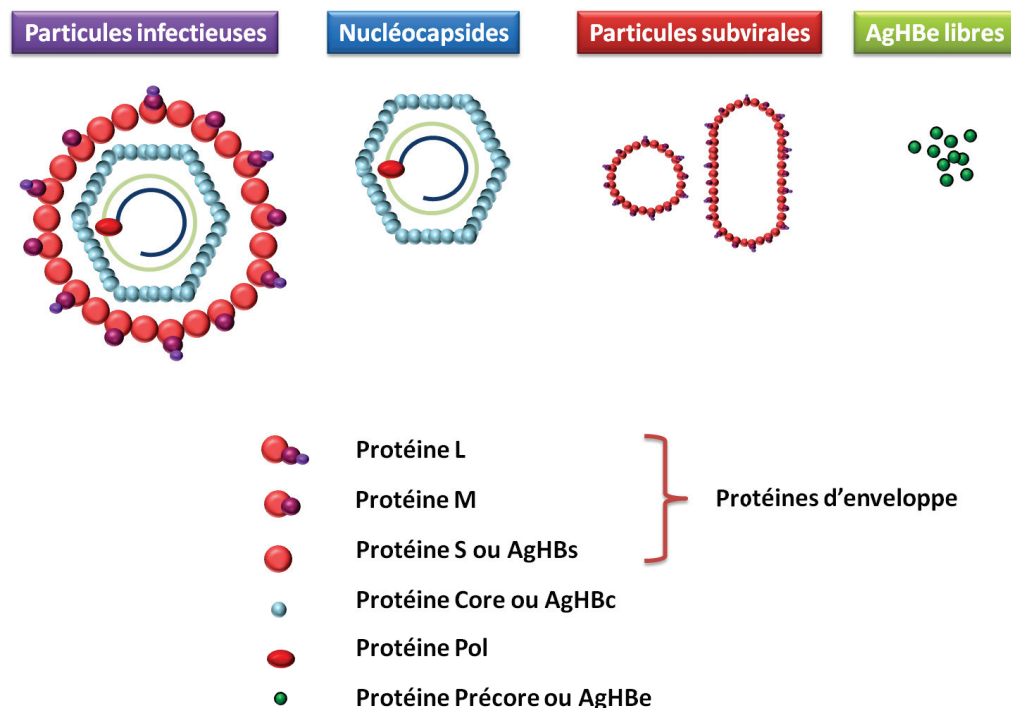


FIGURE 4 : LES DIFFERENTS COMPOSANTS VIRAUX D'UN INOCULUM HBV SECRETES PAR LES HEPATOCYTES INFECTES, ET LEUR COMPOSITION PROTEIQUE



## 1.2.2 Le génome viral

Le virus de l'hépatite B appartient à la famille des *Hepadnaviridae* dont il est le seul représentant humain. Cette famille regroupe des virus hépatotropes, sphériques, enveloppés et à ADN relâché partiellement bicaténaire de 3.2kB (ADN-RC). Le brin de polarité négative (-) correspond au brin complet et transcrit, il est relié de façon covalente en 5' à la polymérase virale grâce à la fonction hydroxyle d'un de ses résidus tyrosines. A l'inverse, le brin de polarité positif (+) correspond au brin incomplet et comporte une extrémité de longueur variable en 3'. Ce brin (+) non transcrit chevauche les extrémités 3' et 5' du brin (-) *via* une région cohésive, d'environ 200 nucléotides, ce qui assure la circularité de l'ADN-RC. Cette région contient également deux séquences directement répétées DR-1 et DR-2 de 11 nucléotides essentielles à la réplication virale (Nassal 1999; Seeger and Mason 2000) (figure 5).

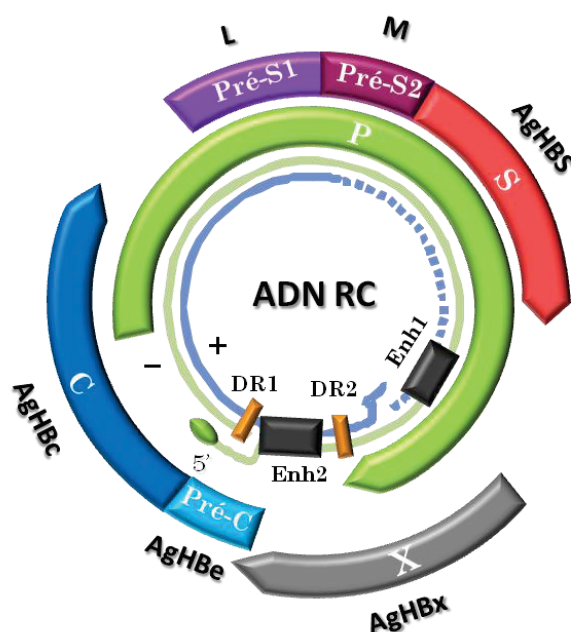


FIGURE 5 : ORGANISATION GENETIQUE DU VIRUS HBV

Le génome HBV est un ADN partiellement circulaire double brins, composé d'un brin (-) complet et d'un brin (+) incomplet, possédant 4 ORFs (ORF PréS1/PréS2/S, ORF P, ORF PréC/C, ORF X) codant 7 protéines virales (L, M, S, X, Pol, Core et l'AgHBe).

L'organisation génomique du HBV est ainsi très compactée et donc complexe. Il possède 4 cadres ouverts de lecture (ORFs pour « Open Reading Frame ») chevauchants codés par le brin (-) qui sont l'ORF P codant la polymérase, l'ORF PréS1/PréS2/S codant les protéines d'enveloppe, l'ORF PréC/C codant la protéine de capside ainsi que pour l'AgHBe sécrété et l'ORF X codant la petite protéine X. Ainsi, ces 4 ORFs contrôlés par des promoteurs distincts (PréS1, PréS2, Core et X) codent sept protéines virales différentes (Moolla, Kew et

al. 2002; Block, Guo et al. 2007). Ceci est rendu possible en modulant le site d'initiation des ARN messagers et en jouant sur l'utilisation de codons d'initiation (ATG) alternatifs pour la synthèse protéique. Par ailleurs, l'épissage de l'ARNpg produit également une protéine appelée HSBP (Soussan, Tuveri et al. 2003).

La petite taille du génome viral explique sa complexité génétique et impose également des contraintes quant aux mutations tolérées par le virus (Seeger C, Mason WS, Zoulim F, Fields Virology, 2006).

- **ORF PréS1/PréS2/S** : localisée au sein de l'ORF P, l'ORF PréS1/PréS2/S permet l'expression des trois protéines d'enveloppe de taille variable : la protéine L (Large; 39 et 42 kDa), la protéine M (Medium; 33 et 37 kDa) et la protéine S (Small ; 24 et 27 kDa). Ces trois protéines, sous le contrôle de trois codons d'initiation différents en phase, sont codées par les régions PréS1, PréS2 et S respectivement.
- **ORF PréCore/Core** : chevauchant partiellement l'ORF P, l'ORF PréCore/Core permet l'expression des protéines PréCore (AgHBe ; 17kDa) et Core (AgHBc ; 21kDa) grâce à deux codons d'initiation différents en phase. La protéine non structurale PréCore (25kDa) est le précurseur de la protéine AgHBe soluble et sécrétée; la protéine Core est l'unité structurale composant la capside virale faite de 240 monomères.
- **ORF P** : cette région, couvrant 80% du génome, code la polymérase virale de 92kDa. Elle comporte quatre régions structurales distinctes possédant pour certaines des activités enzymatiques particulières. En effet, on peut distinguer de 5' en 3' le domaine TP ou « Terminal Protein », le domaine « Spacer », le domaine ADN Polymérase et finalement le domaine RNaseH.
- **ORF X** : cette région code la petite protéine transactivatrice X (HBx ; 17 KDa) dont le rôle est multiple. Elle jouerait ainsi un rôle dans la réplication virale, la modulation l'immunité innée et dans la progression de la carcinogénèse.

### ***1.2.3 Les régions de régulation transcriptionnelle du génome HBV***

Comme nous le verrons plus tard, la matrice transcriptionnelle virale est l'ADNccc contenu dans le noyau des hépatocytes infectées (Levrero, Pollicino et al. 2009). L'expression des gènes viraux est contrôlée principalement au niveau transcriptionnel grâce à 4 promoteurs distincts, 2 « enhancers », un site unique de polyadénylation localisé au niveau du gène Core ainsi qu'un signal d'encapsidation. Les transcrits ainsi synthétisés par l'ARN polymérase II cellulaire ont la particularité d'être coiffés en 5' et polyadénylés en 3'. Le

génom viral code cinq ARNs différents qui sont l'ARNpg (ARN pré-génomique) de 3.5kB, l'ARNm PréC de taille similaire, l'ARNm préS1 de 2.4kB, l'ARN préS2/S de 2.1kB et l'ARNm X de 0.7kB (figure 6) (Moolla, Kew et al. 2002; Block, Guo et al. 2007; Quasdorff and Protzer 2010; Bar-Yishay, Shaul et al. 2011):

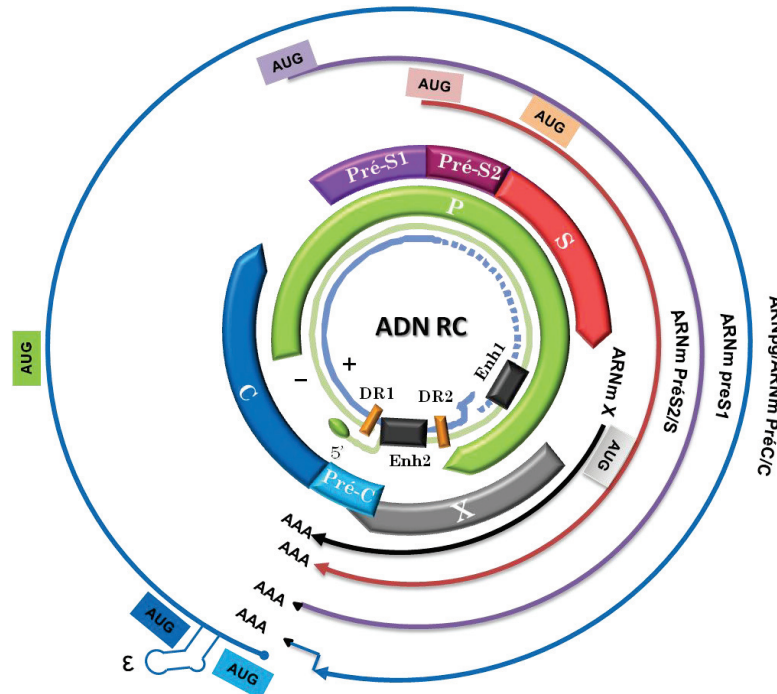


FIGURE 6 : LES DIFFERENTS TRANSCRITS VIRAUX

L'expression des gènes du virus HBV est contrôlée principalement au niveau transcriptionnel, grâce à 4 promoteurs, 2 « enhancers » localisés en amont du promoteur PréCore/Core, un signal d'encapsidation ε et un signal de polyadénylation, codant 5 ARN différents (ARNpg, ARN PréC, ARN préS1, ARN PréS2/S et ARN X).

- Le promoteur PréCore/Core** est un promoteur fort et spécifique du foie. Il permet l'initiation de la transcription de deux ARNs ne différant que de quelques nucléotides : l'ARNm PréCore et l'ARNpg de 3,5 kB chacun (approximativement 1,1 génome). Le premier ARN transcrit, le plus long, est initié en amont de l'ATG de la protéine PréCore et permet ainsi la synthèse de cette protéine, également appelée AgHBe. Le deuxième ARN, plus court mais synthétisé de façon plus abondante, est initié en aval du codon ATG initiateur de la protéine PréCore et appelé ARNpg. L'ARNpg sert également de matrice à la traduction des protéines Core et Pol. La synthèse de ces deux ARNs n'est possible que si l'ARN polymérase II ignore le site unique de polyadénylation contenu dans l'ORF Core lors de son premier passage, ceci est une étape essentielle pour le maintien de l'intégrité génétique du virus. Ce promoteur contient une région importante appelée BCP (pour « Basal Core Promotor ») qui possède des boîtes TATA non canoniques, des sites de liaison pour

des facteurs ubiquitaires (SP1, COUP-TF1, PPAR, RXR et TR2), ainsi que pour des facteurs nucléaires hépatiques (HNF3 et HNF4) participant ainsi au tropisme hépatocytaire du virus HBV (Yaginuma and Koike 1989; Yu and Mertz 1997). Il a ainsi été montré que HNF4, COUP-TF1 et TR2 pouvaient réguler négativement la synthèse de l'ARN PréCore, alors que PPAR, SP1 et RXR pouvaient activer l'expression de l'ARN PréCore et de l'ARNpg (Moolla, Kew et al. 2002).

Il existe également une séquence de régulation positive en amont du BCP appelée CURS (pour « Core Upstream Regulatory Sequence ») partageant une structure commune avec l'« enhancer II » qui pourrait activer entre 200 et 2000 fois l'activité promotrice du BCP (Yu and Mertz 1996).

En plus des régions de régulation positive, il existe également un domaine NRE en amont du BCP capable d'inhiber l'activité promotrice du promoteur PréCore/Core jusqu'à 11 fois (Chen and Ou 1995).

- **Le promoteur Prés1** permet l'initiation de la transcription de l'ARNm de la protéine Prés1 de 2,4 kB. Ce promoteur comporte une boîte TATA classique interagissant avec les facteurs TBP et TFIID ainsi qu'un site de liaison pour HNF1 en amont assurant son activité basale (Raney, Easton et al. 1994). Son activité peut également être modulée grâce à une séquence de régulation positive pouvant interagir avec les facteurs NF1, SP1 et HNF3 (Raney, Zhang et al. 1995) mais également une séquence de régulation négative CCAAT contenu dans le promoteur Prés2 pour maintenir une stœchiométrie optimale entre les différentes protéines d'enveloppe (Bulla and Siddiqui 1989; Lu, Chen et al. 1995).
- **Le promoteur Prés2** permet l'initiation de la transcription de deux ARNs messagers : l'ARNm Prés2 et l'ARNm S de 2,1 kB chacun. Ce promoteur ne possède pas de boîte TATA mais un motif CCAAT interagissant avec NFY et CBF, ainsi que deux éléments positifs de régulation de la transcription capable d'induire l'expression des ARNs Prés2 et S, mais aussi de freiner l'activité transcriptionnelle du promoteur Prés1 (Zhou and Yen 1991). Une mutation au sein de ce promoteur pourrait induire une dérégulation de la synthèse des 3 protéines d'enveloppe aboutissant à une inhibition de la sécrétion des virions (Lu, Chen et al. 1995). L'accumulation de protéines L au niveau du RE pourrait également induire un stress activant indirectement le promoteur Prés2, rétablissant ainsi une stœchiométrie optimale entre les différentes protéines d'enveloppe (Moolla, Kew et al. 2002).
- **Le promoteur X** permet l'initiation de la transcription de l'ARNm codant la protéine X de 0,9 kB (Zheng, Riegler et al. 1994). Il est localisé 140 pb en amont du site d'initiation de la transcription et chevauche l'« enhancer I » au niveau de sa région 3'. Comme la plupart des promoteurs HBV, le promoteur X ne comporte pas de boîte TATA classique ou de séquences riches en GC, mais des sites de fixation LSR pour des

éléments de régulation spécifiques du foie (HNF3 et HNF4), ainsi que pour des facteurs de transcriptions ubiquitaires tels NF1, CREB/ATF, NRF1, RXR, COUP-TF, C/EBP, AP1 et c-Jun activant l'expression de l'ARNm X (Guo, Bell et al. 1991; Fukai, Takada et al. 1997). Il a également été démontré que P53 pouvait interagir avec le promoteur HBx pour inhiber son activité (Takada, Kaneniwa et al. 1996; Benhenda, Cougot et al. 2009).

De façon minoritaire, ils existent également d'autres ARNs viraux épissés produits à partir de l'ORF X. Certains peuvent même être encapsidés aboutissant ainsi à la formation de particules défectives retrouvées dans les *sera* des patients chroniquement infectés par HBV. Il est à noter que l'un de ces ARNs épissés code une protéine non classique : la protéine HSBP (Hepatitis B Spliced Protein). Celle-ci pourrait jouer un rôle dans la fibrose, l'apoptose et dans la persistance virale (Soussan, Tuveri et al. 2003; Mancini-Bourguine, Bayard et al. 2007).

La régulation de la réplication du HBV est également assurée par les 2 « enhancer » localisés en amont du promoteur PréCore/Core (figure 6) :

- **L' « enhancer I »**, composé de 270 pb environ, est situé entre les ORF S et X et chevauche partiellement le promoteur X. Il permet une augmentation importante de la transcription de l'ARNpg, de l'ARN PréCore/Core et de l'ARN X, alors que son effet reste modeste sur la transcription des ARNm des protéines d'enveloppe. Il possède des domaines distincts : un domaine régulateur en 5', un domaine core central porteur de l'activité transactivatrice et un domaine régulateur en 3' qui chevauche partiellement l'ORF X (Fukai, Takada et al. 1997). Le domaine central possède des sites de liaison pour les facteurs de transcription HNF3, RFX1, EFC, NF1, HNF4, PPAR, COUP-TF et STAT3 (Chen, Hieng et al. 1994; Ori and Shaul 1995; Kosovsky and Siddiqui 1999; Bock, Malek et al. 2000; Waris and Siddiqui 2002). Il a récemment été montré que la voie de signalisation des œstrogènes pouvait inhiber la transcription du génome virale *via* l'interaction entre HNF4 et ER- $\alpha$  au niveau de cet « enhancer », ce qui pourrait expliquer en partie la différence d'évolution de la maladie en fonction du sexe de l'hôte (Wang, Yeh et al. 2012). Les domaines régulateurs positionnés en 5' et en 3' du domaine central permettent également de stimuler l'activité promotrice de l' « enhancer I » de 10 fois *via* son interaction avec les facteurs de transcription HNF1 et C/EBP. L' « enhancer I » aurait également un rôle dans l'activation séquentielle de la transcription des ARNs viraux en transactivant les gènes précoces et en permettant une fonctionnalité optimale de l' « enhancer II » plutôt responsable de la transcription des gènes tardifs (Doitsh and Shaul 2004). Par ailleurs, un motif ISRE/IRE a également été découvert au niveau du domaine de l' « enhancer I » chevauchant avec l'ORF X. Ce motif pourrait ainsi interagir avec des facteurs de transcription de la famille des IRF et des STAT permettant une meilleure activité transactivatrice de l' « enhancer I » (Tur-Kaspa, Teicher et al. 1990; Alcantara, Tang et

al. 2002; Belloni, Allweiss et al. 2012). L'« enhancer I » pourrait également être régulé positivement par la protéine HBx.

- **L'« enhancer II »** de 105 pb est localisé immédiatement en amont du BCP et chevauche la séquence de régulation CURS du promoteur PréCore/Core. Il est composé de deux régions distinctes (IIA et IIB) et stimule la transcription des ARNm des protéines d'enveloppe, mais également de l'ARNm X (Yuh and Ting 1990). Les régions IIA et IIB ne possèdent pas d'effet transactivateur *per se* et doivent agir en synergie pour permettre une activité promotrice optimale de l'« enhancer II ». Ces régions comportent de nombreux sites de liaison pour des facteurs activateurs de transcription ubiquitaires ou hépato-spécifiques tels SP1, HNF3, HNF4, PPAR, C/EBP, FTF, RXR et HFL (pour « Hepatocyte Leukemia Factor »), mais peuvent également être soumises à une régulation négative *via* le domaine NRE du promoteur PréCore/Core (Chen, Huang et al. 1995; Li, Xie et al. 1995; Ishida, Ueda et al. 2000; Li and Ou 2001).

## **I.2.4 Les protéines virales**

### **I.2.4.1 Les protéines d'enveloppe**

Codées par l'ORF S, l'expression des trois protéines d'enveloppe (S, M et L) est initiée à partir de trois codons ATG différents, et terminées par un codon stop commun (figure 7). Ces protéines possèdent ainsi le même domaine C-terminal et diffèrent par leur extrémité N-terminale (Heermann, Goldmann et al. 1984). Elles sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et s'oligomérisent en complexe protéique hétéro- ou homo-dimérique, *via* des résidus cystéines contenus dans le domaine S (Wounderlich and Bruss 1996), pour former l'enveloppe, et *in fine* les particules virales et subvires (Bruss 2007; Patient, Hourieux et al. 2009; Schadler and Hildt 2009).

- **La protéine S (ou AgHBs)**, de 226 acides aminés, est le composant majeur de l'enveloppe et peut être retrouvée sous forme glycosylée dans 50% des cas au niveau du résidu asparagine 146 (Peterson, Nath et al. 1982). Elle est composée de quatre domaines hydrophobes ancrés au niveau du RE (TM1 à TM4) formant des hélices membranaires. Le domaine N-terminal de la protéine se retrouve ainsi localisé dans la lumière du RE, alors que le domaine C-terminal se retrouve au niveau du cytoplasme (Eble, MacRae et al. 1987). Plus particulièrement, entre les régions d'ancrage TM2 et TM3 se trouve la boucle antigénique immuno-dominante avec le déterminant « a » qui est la cible des anticorps anti-HBs neutralisants (figure 8). L'AgHBs est ainsi la base des vaccins anti-HBV recombinants actuels.



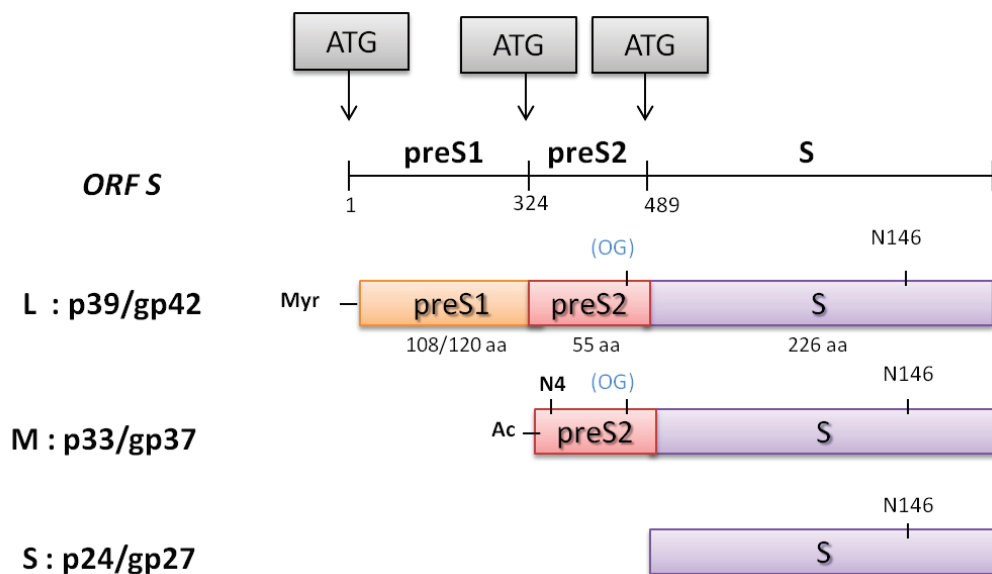


FIGURE 7 : LES TROIS PROTEINES D'ENVELOPPE DU HBV (S, M ET L)

- **La protéine M (ou PréS2)** contient toute la séquence de la protéine S additionnée de 55 acides aminés en position N-terminale (Eble, Lingappa et al. 1990). Elle est également ancrée au niveau du RE *via* les régions TM1 à TM4, et possède de plus un site de N-glycosylation au niveau de l'asparagine 4 occupé dans 100% des cas, son abolition induisant un mauvais repliement de la protéine M (Stibbe and Gerlich 1983) (figure 8). Cette protéine peut également être retrouvée sous une forme O-glycosylée (Thr-37) selon les génotypes (Schmitt, Glebe et al. 2004). La protéine M ne semble pas essentielle à la réplication et à la morphogénèse des particules virales (Fernholz, Stemler et al. 1991), et son absence dans la famille des *Avihepadnaviridae* semble conforter cette idée. Elle pourrait cependant être impliquée dans la morphogénèse virale. De plus, une délétion au sein de la partie PréS2 induirait la formation d'hépatocytes « vitreux » impliquée dans la carcinogénèse hépatique.
- **La protéine L (ou PréS1)** est de longueur variable et contient 108 à 120 acides aminés supplémentaires par rapport à la protéine M selon le génotype. Elle est essentielle pour la formation de particules virales infectieuses. Contrairement à la protéine M, la grande protéine d'enveloppe n'est glycosylée que sur l'asparagine 146 du domaine S (soit l'Asn 201 de la protéine L). Elle possède également dans sa partie N-terminale un site de myristylation (glycine 2) nécessaire à l'ancrage de la protéine dans la membrane de l'enveloppe (Persing, Varmus et al. 1987). La protéine L possède deux topologies structurales distinctes en fonction du cycle viral (Guo and Pugh 1997). Dans sa conformation initiale nommée i-preS (pour « internal preS»), les régions PréS1 ainsi que PréS2 et la région TM1 se retrouvent toutes du côté cytosolique (Bruss and Vieluf 1995). Ainsi, elles peuvent interagir avec les nucléocapsides grâce aux séquences PréS1 toujours présentes dans le cytoplasme. Lors du bourgeonnement de

la particule virale, les régions Prés1 et Prés2 se retrouvent à la surface de la particule virale et la région TM1 redevient transmembranaire. Cette dernière topologie permettant ainsi l'interaction entre le domaine Prés1 et les hépatocytes est finalement nommée e-preS (pour « external preS ») (Urban and Gripon 2002; Gripon, Cannie et al. 2005). Cette double conformation n'est possible que grâce à une séquence de 28 acides aminés (résidus 70 à 94), appelé domaine cytosolique d'ancrage (CAD), jouant un rôle dans le maintien de la topologie i-preS de la protéine L (Löffler-Mary, Werr et al. 1997) (figure 8). Ces changements de topologie pourraient également être facilités par l'interaction de la protéine L avec des chaperonnes cellulaires telles Hsc70, Hsp40 et BiP (Lambert and Prange 2003).

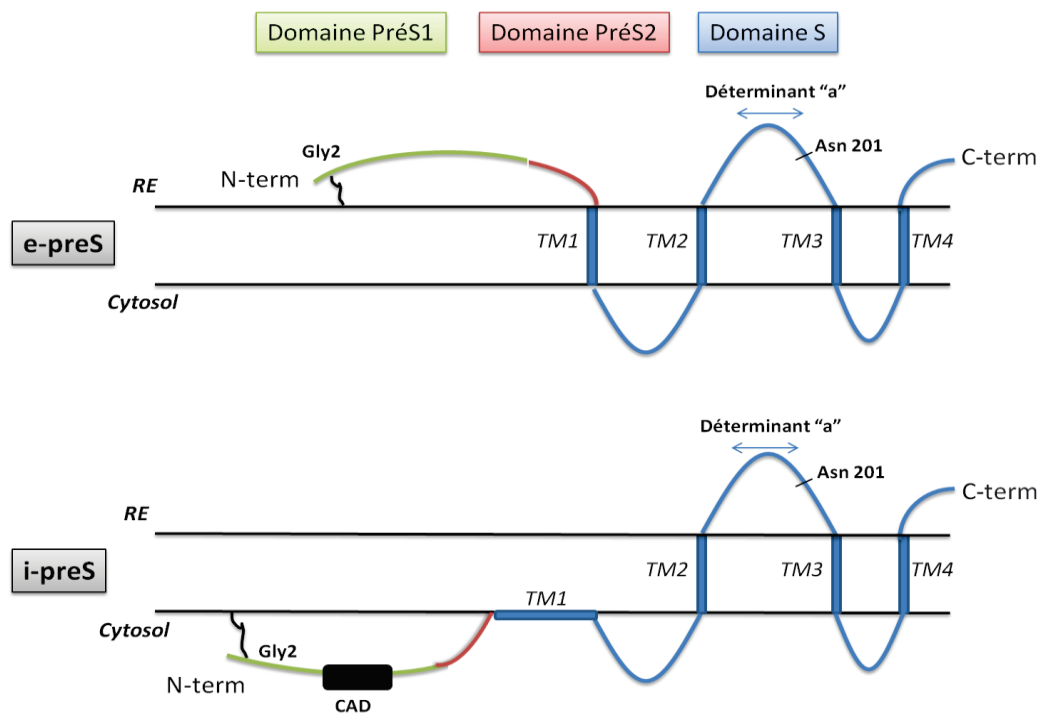


FIGURE 8 : LA DOUBLE TOPOLOGIE DE LA PROTEINE L

#### 1.2.4.2 Les protéines Core et PréCore

Les protéines Core et PréCore sont toutes deux codées par l'ORF PréCore/Core à partir de deux codons initiateurs différents en phase (figure 9) (Bruss 2007; Patient, Hourieux et al. 2009; Schadler and Hildt 2009).

- **La protéine Core ou AgHBc** est composée d'environ 183 à 185 acides aminés selon le génotype et correspond à l'unité structurale de la capside (Chain and Myers 2005). Deux domaines protéiques avec des fonctions biologiques distinctes peuvent être identifiés : le domaine N-terminal (NTD) et le domaine C-terminal (CTD) ou « protamine domain ».



Le **domaine NTD** est impliqué dans la formation des dimères et dans leur auto-assemblage en capsides. Ce domaine est composé des 149 ou 151 premiers acides aminés de la protéine selon le génotype. La protéine Core est en effet capable de s'assembler en capsidicosaédrique de symétrie T=3 ou T=4, *via* oligomérisation des 180 ou 240 monomères respectivement, mais est retrouvée majoritairement (90 %) sous la topologie T=4 dans les virions (Crowther, Kiselev et al. 1994; Zlotnick, Cheng et al. 1996; Roseman, Berriman et al. 2005). Pour se faire, la morphogénèse de la capsidicommence par la formation de dimères de Core liés de façon covalente au niveau de leur cystéine 61 (Nassal, Rieger et al. 1992). La trimérisation de ces dimères, dépendante de la quantité de protéines Core disponibles dans la cellule, déclencherait ensuite l'initiation de l'assemblage de la capsidic(Zlotnick, Johnson et al. 1999). D'un point de vue thermodynamique, l'énergie issue de la compaction de l'ARN viral par les protéines Core jouerait un rôle prédominant en amorçant les premières étapes d'assemblage de la nucléocapsidic. Par la suite, l'énergie issue de l'interaction entre les protéines Core elle-même serait requise pour les étapes plus tardives d'assemblage (Zlotnick, Porterfield et al. 2013). La capsidicvirale possède également la particularité d'être fenestrée, ce qui pourrait permettre une diffusion libre des nucléotides incorporés dans l'ADN viral lors de la rétrotranscription qui se produit à l'intérieur de la nucléocapsidic.

La **région CTD** ou « protamine domain » est impliquée dans l'encapsidation de l'ARNpg et la réplication de l'ADN (Gallina, Bonelli et al. 1989). En effet, une séquence très basique composée de plusieurs résidus arginines et de sérines potentiellement phosphorylables permettrait l'interaction entre la capsidicet l'ARNpg ou l'ADN viral néosynthétisé (Nassal 1992; Kock, Nassal et al. 2004). En plus du complexe ribonucléoprotéique Polymérase-ARNpg, plusieurs chaperonnes cellulaires ainsi que des kinases (SRPK1, SRPK2 et PKCS) sont encapsidées au sein de la capsidicpendant la morphogénèse virale (Kann, Thomssen et al. 1993; Beck and Nassal 2003; Hu, Flores et al. 2004; Enomoto, Sawano et al. 2006).

Plus particulièrement, le domaine CTD contient plusieurs résidus sérines qui, après phosphorylation, neutralisent les charges positives du domaine CTD basique induisant ainsi un changement conformationnel de la protéine Core. Plus particulièrement, trois résidus sérines en position 155, 162 et 170 ont été décrits comme des sites importants impliqués dans l'encapsidation de l'ARNpg et la réplication virale (figure 9) (Liao and Ou 1995). Il semblerait en effet que l'état de phosphorylation de la protéine Core soit associé au niveau de maturation de la nucléocapsidic (Le Pogam, Chua et al. 2005). Les nucléocapsides immatures contenant un génome hybride ADN/ARN sont ainsi retrouvées hautement phosphorylées, alors qu'une déphosphorylation graduelle se met en place progressivement pendant la synthèse de l'ADN RC lors de la maturation des capsides (Perlman, Berg et al. 2005; Roseman, Berriman et al. 2005). De part leur nouvelle

conformation acquise suivant les jeux de phosphorylations et déphosphorylations, seuls les nucléocapsides matures pourraient ensuite interagir avec les protéines d'enveloppe au niveau du ERGIC (pour « post-ER, pre-Golgi Compartment ») (Mabit and Schaller 2000; Bruss 2004; Dryden, Wieland et al. 2006). A l'inverse, les nucléocapsides entrantes ainsi qu'une partie des nucléocapsides nouvellement synthétisées sont prises en charge et dirigées par le réseau de microtubules jusqu'au pore nucléaire et interagissent avec les NPC (pour « Nuclear Pore Complex ») (Kann, Schmitz et al. 2007; Schmitz, Schwarz et al. 2010). Ainsi, le domaine CTD agirait également comme une séquence NLS (Li, Huang et al. 2010). Dès lors, des délétions au sein des motifs riches en sérines et arginines préviendraient de la phosphorylation de ce domaine, et retiendraient ainsi la protéine Core dans le cytoplasme (Eckhardt, Milich et al. 1991; Liao and Ou 1995). La distribution cellulaire de la protéine Core serait ainsi dépendante de l'état de phosphorylation de ces motifs mais également du cycle cellulaire (Weigand, Knaust et al. 2010). Pour délivrer l'ADN viral dans le noyau, les nucléocapsides doivent tout d'abord se désassembler en dimères. Elles pourront ensuite se réassembler dans le noyau et être exportées à nouveau *via* deux séquences NES leur permettant d'interagir avec des protéines de la famille des TAP impliquée dans l'export des ARNm et des protéines (Rabe, Delaleau et al. 2009; Li, Huang et al. 2010).

- **La protéine PréCore** est tout d'abord synthétisée sous la forme d'un polypeptide précurseur de 25 kDa (P25) codé par 212 acides aminés. La partie N-terminale, codée par la région PréCore (29 acides aminés), est très hydrophobe et joue le rôle de peptide signal permettant l'adressage de la protéine au niveau du RE, où celle-ci subira différentes étapes de maturation. Le premier clivage de 19 acides aminés au niveau du domaine PréCore, par une signal peptidase, permettra l'obtention de la forme P22 ne différant que de 10 acides aminés de la protéine Core (Dienes, Gerken et al. 1995). Ensuite, au niveau du Golgi, la queue basique en position C-terminale du précurseur P22 pourra être clivée pour former l'AgHBe de 17 kDa (Messageot, Salhi et al. 2003; Kimura, Ohno et al. 2005). Cette protéine soluble et sécrétée sous forme dimérique partage donc de fortes homologues de séquence avec l'AgHBc, sans pour autant partager d'épitopes neutralisants communs (Maruyama, McLachlan et al. 1993; Walsh, Nuttall et al. 2011). Elle n'est pas impliquée directement dans la réplication virale mais pourrait plutôt avoir des propriétés immunomodulatrices (Chang, Enders et al. 1987; Walsh and Locarnini 2012). Plus précisément, elle exercerait un rôle tolérigène sur les lymphocytes T spécifiques de l'AgHBc (Chen, Billaud et al. 2004). En effet, l'AgHBc est plus immunogène que l'AgHBe et induit préférentiellement une réponse de type Th1 plus fréquemment associée à la résolution de l'infection. L'AgHBe pourrait ainsi participer à l'établissement de l'infection et à la chronicité en inhibant les réponses de type Th1 et en favorisant un profil de type Th2 (Milich and Liang 2003). L'AgHBe possède également la capacité de

passer la barrière placentaire et d'exercer ainsi son effet tolérigène *in utero*, ce qui expliquerait, en partie du moins, le fréquent passage à la chronicité observée lors de la transmission verticale de l'infection (Milich, Jones et al. 1990). Le virus HBV n'est pas cytopathique *per se* mais il peut engendrer une forte inflammation des tissus suivie de lésions hépatiques. Des souches virales mutantes défectives pour la production d'AgHBe ont ainsi été fréquemment associées à des hépatites fulminantes (Harrison 2006; Khare, Negi et al. 2012).

La forme intracellulaire de la protéine PréCore (P22) possède également la propriété de s'assembler pour des former des capsides dépourvus d'acides nucléiques (Kimura, Ohno et al. 2005). Ces « pseudo-capsides » moins stables que les nucléocapsides classiques peuvent cependant être enveloppées et sécrétées (Watts, Conway et al. 2011). Elles pourraient également participer à l'immunotolérance viro-induite responsable en partie de la persistance de l'infection (Visvanathan, Skinner et al. 2007; Lang, Lo et al. 2011).

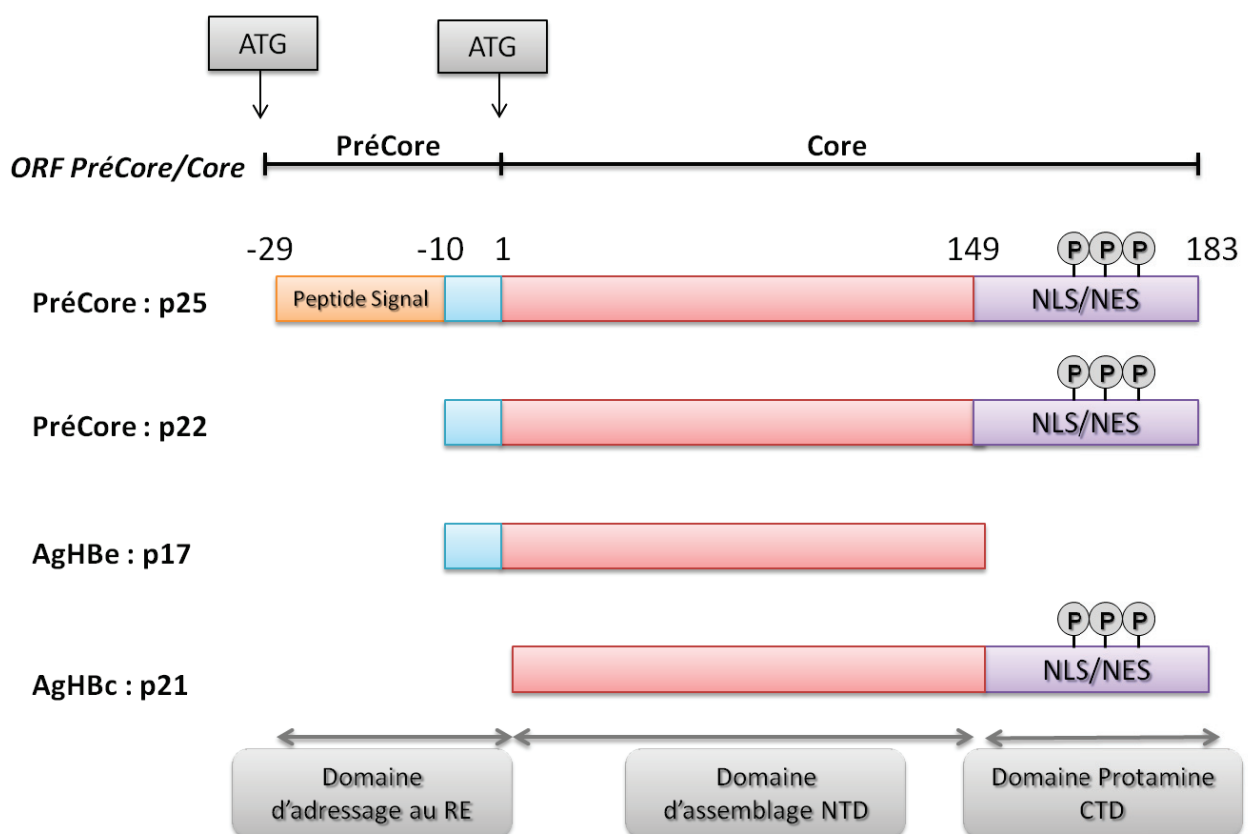


FIGURE 9 : LES PROTEINES CORE ET PRECORE DU HBV

### 1.2.4.3 La polymérase

Codée par l'ORF P, la polymérase du HBV (~843 acides aminés) est pourvue à la fois d'une activité polymérase ARN-dépendante (ou transcriptase inverse), d'une activité polymérase ADN-dépendante, plus classique, mais également d'une activité RNaseH. Ces activités enzymatiques sont portées par des sous-unités protéiques différentes. Quatre domaines structuraux et fonctionnels distincts peuvent ainsi être identifiés (figure 10) (Beck and Nassal 2007; Nassal 2008):

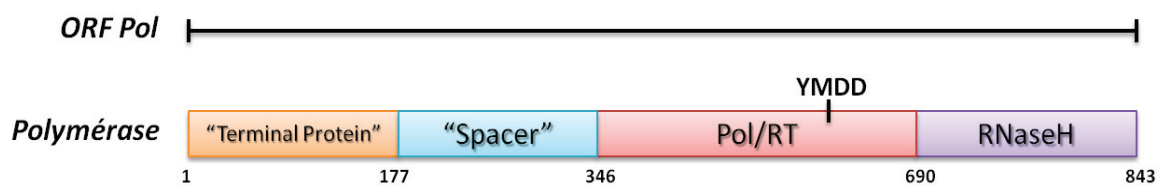


FIGURE 10 : LES DIFFERENTS DOMAINES DE LA POLYMERASE DU HBV

- **Le domaine TP ou « terminal protein »** est constitué des 177 premiers acides aminés de la protéine. Il permet la liaison covalente de la Pol avec le génome viral par liaison phosphodiester avec le premier nucléotide du brin (-). Ainsi, la polymérase virale peut elle-même amorcer la synthèse d'ADN à partir d'un résidu tyrosine (Tyr 63) du domaine TP (Zoulim and Seeger 1994; Lanford, Notvall et al. 1997). Par ailleurs, un motif hautement conservé (AGILYKR), nommé T3, aurait également été identifié, et jouerait le rôle de point de contact entre les domaines TP et RT permettant ainsi l'initiation de la rétrotranscription (Cao, Badtke et al. 2005; Stahl, Beck et al. 2007).
- **Le domaine « Spacer »** est constitué des résidus 178 à 346 environ. Il assurerait la flexibilité de la protéine permettant ainsi le bon fonctionnement de ses activités catalytiques. Sa séquence protéique n'étant pas primordiale, ce domaine peut tolérer de nombreuses mutations, délétions et insertions ce qui explique la variabilité dans la longueur de la polymérase (Radziwill, Tucker et al. 1990).
- **Le domaine RT/ADN polymérase** est constitué des résidus 347 à 690 environ et divisé en sept sous-domaines notés de A à G. Deux fonctions enzymatiques lui sont associées : une fonction transcriptase inverse (RT) et une fonction ADN polymérase ADN-dépendante. De part sa fonction « RT », responsable de la rétrotranscription de l'ARNpg en brin d'ADN (-), ce domaine possède certaines homologies avec les polymérases rétrovirales et ceci particulièrement au niveau de son site catalytique, composé du motif YMDD très conservé, dans le sous-domaine C (Bartholomeusz,

Tehan et al. 2004; Steitz 2006). La reverse transcriptase ne possède pas d'activité exonucléasique 3'-5' ce qui donne lieu à des erreurs de polymérisation ( $1,4-3,2 \times 10^5$  substitutions par site et par an) dans la matrice ADN nouvellement synthétisée (Okamoto, Imai et al. 1987; Park, Kim et al. 2003). Quant à la fonction ADN polymérase ADN-dépendante, celle-ci permet la synthèse du brin d'ADN (+) à partir du brin d'ADN (-), et ainsi la formation de l'ADN RC. Ce domaine protéique complexe est donc essentiel à la réplication virale et peut être affecté rapidement par des modifications génétiques.

- **Le domaine RNaseH** est constitué des résidus 691 à 843 environ. De part son action ribonucléasique, il permet la dégradation des séquences ARNs contenues dans des molécules hybrides ADN/ARN, et donc la dégradation de l'ARNpg lors de la synthèse du brin d'ADN (+).

Du fait de ses activités enzymatiques précédemment décrites, la polymérase virale est une cible majeure dans la mise en place de stratégies antivirales *via* l'utilisation des analogues de nucléos(t)ides. Cependant, ne possédant pas d'activité exonucléasique 3'-5' permettant de corriger d'éventuelles erreurs de rétrotranscription de l'ARNpg, l'apparition de quasi-espèces virales et de mutations de résistance est observée sous la pression de sélection engendrée par ces antiviraux, ce qui pose à l'heure actuelle un réel problème clinique (Locarnini and Zoulim 2010; Zoulim and Locarnini 2013).

#### ***1.2.4.4 La protéine X***

Codée par l'ORF X, la protéine X ou AgHBx est la plus petite protéine virale du HBV avec une taille de 17KDa (154 acides aminés), et ne montrant aucune homologie avec d'autres protéines connues (Miller and Robinson 1986). Selon les dernières études, il semblerait que la protéine X soit prédominante dans le compartiment nucléaire lorsqu'elle est exprimée en faible quantité, puis qu'elle s'accumule dans le cytoplasme quand sa concentration augmente (Cha, Ryu et al. 2009). L'AgHBx est une protéine non structurale qui possède de multiples activités transactivatrices virales et cellulaires (Kew 2011; Fallot, Neuveut et al. 2012; Andrisani 2013). Elle pourrait en effet déréguler les voies de signalisation cellulaire et ainsi participer à l'échappement immunitaire et à la carcinogénèse hépatique viro-induite.

Elle ne possède pas de propriétés de liaison directe à l'ADN mais *via* l'interaction avec d'autres protéines, telles que certains facteurs de transcription et effecteurs cellulaires, elle peut perturber les voies de signalisation Ras, Raf, c-Jun, MAPK, NFkB, JAK/STAT, Src, PKC, Akt et PI3K impliquées, entre autres, dans le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Andrisani and Barnabas 1999; Murakami 2001; Bouchard, Wang et al. 2006; Tang, Oishi et al. 2006; Kew 2011; Andrisani 2013).

Au niveau épigénétique, elle induirait l'expression de DNMTs (pour « DNA méthyltransférases »), ainsi que la dégradation d'histones méthylases (Suv12 et Znf198) de la famille PRC2 (pour « Polycomb Repressive Complex 2 ») fréquemment associée à l'hépatocarcinogénèse (Wang, Studach et al. 2011). L'AgHBx pourrait également interagir avec des histones déacéthylases (HDAC) pour inhiber l'expression de certains suppresseurs de tumeurs tels p16, MT1 and miR-132 (Park, Sohn et al. 2007; Zheng, Zhang et al. 2009; Zhu, Zhu et al. 2010; Wei, Tan et al. 2013). Il a également été démontré que, en interagissant avec le complexe acétyltransférases CBP/p300, la protéine X pouvait activer la transcription de divers gènes cibles CREB-dépendants (Cougot, Wu et al. 2007). Or, CREB pourrait être impliqué dans le processus d'hépatocarcinogénèse (Abramovitch, Tavor et al. 2004) ce qui conforte le pouvoir potentiellement pro-oncogène de la protéine X.

La protéine HBx perturberait également le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN en interagissant avec DDB1 (Bontron, Lin-Marq et al. 2002). Plusieurs équipes ont démontré également que la protéine HBx pouvait inhiber p53, par répression transcriptionnelle et/ou rétention cytoplasmique, et ainsi moduler les différentes voies qui lui sont associées, telles l'apoptose et la réparation de l'ADN (Takada, Kaneniwa et al. 1997; Lee and Rho 2000; Diao, Garces et al. 2001). Cette protéine virale régulerait également les voies de signalisation intracellulaire en inhibant le protéasome par fixation sur la sous unité 20S (Hu, Zhang et al. 1999; Cui, Wang et al. 2006). Au niveau mitochondriale, en interagissant avec BCL-2 et en perturbant les échanges ioniques, HBx pourrait avoir un effet pro-oncogène *via* son interaction avec c-Myc et la modulation de la concentration calcique respectivement (McClain, Clippinger et al. 2007). L'AgHBx pourrait également induire l'expression de gènes proinflammatoires tels TNF- $\alpha$ , iNOS et IL-6 et ainsi altérer l'équilibre entre apoptose et prolifération (Lara-Pezzi, Majano et al. 1998; Majano, Lara-Pezzi et al. 2001).

Le rôle oncogénique direct de la protéine HBx n'a cependant pas été clairement démontré (Su, Schroder et al. 1998; Terradillos, Pollicino et al. 1998; Schuster, Gerlich et al. 2000; Longato, de la Monte et al. 2009). Malgré tout, il apparaît de plus en plus évident que cette protéine virale pourrait être un oncogène faible et/ou un cofacteur participant à la transformation hépatocellulaire *via* son action pléiotropique sur la cellule infectée (cf. partie « La carcinome hépatocellulaire »).

La protéine X joue également un rôle essentiel dans le cycle viral. En effet, elle serait nécessaire à l'établissement de l'infection, *in vivo* dans le modèle de la marmotte infectée par le WHV (pour « Woodchuck Hepatitis Virus ») (Zoulim, Saputelli et al. 1994), mais également *in vitro* comme démontré dans le modèle HepaRG (Lucifora, Arzberger et al. 2011). Cette protéine est en effet capable de maintenir le cccDNA, matrice virale nécessaire à la transcription des ARNs viraux, dans un état « actif » en empêchant la dé-acétylation des histones (Belloni, Pollicino et al. 2009; Levrero, Pollicino et al. 2009). Parallèlement, HBx pourrait augmenter la réplication virale en favorisant la stabilité des capsides et la

phosphorylation des protéines Core induite par les kinases Src (Melegari, Wolf et al. 2005; Benhenda, Cougot et al. 2009). Par ailleurs, il a été montré que cette protéine virale, en interagissant avec la PI3K, pouvait initier un processus d'autophagie cellulaire permettant également d'augmenter la réplication virale (Mao, Da et al. 2011). La dérégulation épigénétique induite par la protéine X telle que l'inhibition des enzymes de méthylation Suv12 et Znf198, ainsi que son interaction avec DDB1, pourraient également participer à la réplication virale (Wang, Studach et al. 2011; Hodgson, Hyser et al. 2012).

Finalement, elle pourrait également participer à l'échappement immunitaire du virus en dégradant MAVS, un adaptateur des voies de signalisation NFkB et IRF3. Elle bloquerait ainsi l'expression du gène IFN- $\beta$  en interférant avec la signalisation RIGI-IPS1-TRAF3 (Jiang and Tang 2010; Wei, Ni et al. 2010; Yu, Chen et al. 2010; Kumar, Jung et al. 2011) (cf. partie « L'interaction entre HBV et le système immunitaire inné »).

## ***1.2.5 Le cycle de réplication***

L'étude du cycle de réplication du HBV, et en particulier les étapes précoces d'infection, ont souffert jusqu'à très récemment du manque de modèles *in vitro* appropriés permettant la réplication du virus. Ainsi, des avancées majeures dans la compréhension du cycle de réplication viral des hépadnavirus ont été réalisées grâce au modèle du DHBV (Le Pogam and Shih 2002). Ces données obtenues ont été ultérieurement confirmées pour les orthohépadnavirus avec le modèle du WHV, mais aussi dans des lignées hépatocytaires transfectées/transduites par un vecteur délivrant le génome HBV au sein de ces cellules non permissives. Ces travaux ont permis une meilleure compréhension du cycle cellulaire et de la réplication virale avant la découverte des modèles HepaRG et PHH supportant un cycle de réplication complet (cf. partie « Modèles expérimentaux ») (figure 11).

### ***1.2.5.1 De l'interaction du virus avec l'hépatocyte à son internalisation dans le cytoplasme***

Les étapes précoces du cycle cellulaire et en particulier l'interaction virus/cellule hôte étaient encore mal compris jusqu'à très récemment. En effet, des données mettaient en relief l'implication des molécules d'héparane sulfates dans la liaison virus/cellule hôte (Schulze, Gripon et al. 2007; Leistner, Gruen-Bernhard et al. 2008). De nombreuses protéines avaient ainsi été identifiées comme potentiels récepteurs du HBV telles l'annexine V, l'apolipoprotéine H, le récepteur des Immunoglobulines A, la carboxypeptidase, l'asialoglycoprotéine... (Glebe and Urban 2007). Cependant, une équipe a récemment mis en évidence l'implication d'un transporteur des acides biliaires appelé NTCP dans l'internalisation du virus HBV dans l'hépatocyte. Ainsi, son inhibition par des siRNA abolirait la permissivité virale de cellules infectables tels les hépatocytes primaires humains et les



cellules HepaRG. A l'inverse, l'équipe de recherche a également pu restaurer la permissivité de cellules d'hépatomes à l'infection HBV, en rétablissant l'expression du récepteur NTCP normalement absent dans ces modèles cellulaires (Yan, Zhong et al. 2012).

En ce qui concerne les structures virales impliquées, des équipes de recherche ont montré que le domaine Prés1 était impliqué dans l'interaction du virus avec l'hépatocyte, et plus particulièrement le motif QLDAPF correspondant aux acides aminés 18 à 25 en partie N-terminale (Paran, Geiger et al. 2001). La myristylation de la glycine 2 du domaine Prés1 permettrait également une liaison de plus haute affinité entre les deux partenaires, et ceci majoritairement dans les cellules hépatocytaires différenciées (Gripon, Le Seyec et al. 1995; Meier, Mehrle et al. 2012). Confirmant l'implication spécifique de ce domaine, un peptide anti-Prés1 permettant d'inhiber efficacement l'infection HBV et HDV *in vitro* et *in vivo* a finalement été décrit (Schieck, Muller et al. 2010; Volz, Allweiss et al. 2012). En plus du domaine Prés1, il semblerait qu'un élément situé dans la boucle antigénique du domaine S puisse participer à l'infektivité des virus HBV et HDV (Abou-Jaoude and Sureau 2007). Le virus HDV possède en effet la même enveloppe que le virus HBV (dont il est le satellite), et partagerait ainsi les mêmes étapes précoces d'entrée (Sureau 2006; Hughes, Wedemeyer et al. 2011).

Une fois fixé sur son ou ses récepteur(s) spécifiques, HBV pénétrerait dans la cellule par un mécanisme direct de fusion des membranes virale et hépatocytaire, et/ou par endocytose pH indépendante précédant la fusion membranaire. Une fonction fusogénique a ainsi été isolée dans le domaine Prés1 (Nunez, Yelamos et al. 2009) et dans la partie N-terminale du domaine S incluant la région TM1 (Rodriguez-Crespo, Nunez et al. 1999). D'autres équipes ont également décrit un mode alternatif de délivrance de la nucléocapside dans la cellule. En effet, une séquence TLM (« translocation motif ») a été identifiée dans le domaine Prés2 du HBV. Cette séquence est identique à celle d'un peptide perméable membranaire, et est conservée chez tous les *Hepadnaviridae* (Oess and Hildt 2000). La fusion entre le domaine TLM et l'AgHBc procurerait à la capside la capacité de transloquer dans le cytoplasme sans aucune spécificité de récepteur à la membrane, ce qui pourrait offrir à la particule de Dane la possibilité de pénétrer dans divers types cellulaires. Il a d'ailleurs été démontré à partir du modèle DHBV que des particules virales mutées au niveau de la séquence TLM conservaient leur capacité de liaison à la cellule et d'internalisation dans les endosomes, mais que ces dernières étaient incapables de transloquer dans le cytoplasme et s'accumulaient finalement dans les vésicules (Stoeckl, Funk et al. 2006). Certains virus utilisent en effet plus d'un mécanisme d'entrée pour pénétrer au sein d'une cellule (Marsh and Helenius 2006). Ainsi, récemment, il a été décrit dans un modèle d'hépatocytes primaires humains immortalisés que le virus HBV pouvait également utiliser un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant pour pénétrer à l'intérieur des hépatocytes (Huang, Chen et al. 2012).





L'ADN RC contenu dans la capsid doit ensuite être recirculariser grâce à des enzymes cellulaires pour former une matrice transcriptionnelle fonctionnelle appelée ADNccc (ADN circulaire clos covalent) (Bock, Schwinn et al. 2001). Le mécanisme exact de formation de l'ADNccc n'est pas totalement connu mais il nécessite des étapes de réparation de l'ADN ainsi que des modifications de l'ADN RC au niveau des extrémités avant de pouvoir générer l'ADNccc. Ces mécanismes pourront opérer dans le cytoplasme et se poursuivre au niveau du pore nucléaire (Rabe, Delaleau et al. 2009).

La polymérase virale liée de façon covalente au brin codant négatif (-) devra tout d'abord être détachée de la matrice ADN par rupture de la liaison phosphodiester en 5' au sein même de la capsid (Guo, Jiang et al. 2007). Des complexes enzymatiques de clivage tels TDP2 pourraient ainsi participer à la dé-protéinisation de l'ADN RC (Nitiss, Malik et al. 2006; Gao and Hu 2007). Le brin (-) contient également une redondance de nucléotides en 3' qui devra être éliminée lors de l'étape de recircularisation. Le brin positif (+) non codant ne fait que 2/3 du génome environ et comporte en 5' un oligo-ARN qui va servir pour initier la synthèse du brin (-). En plus de l'implication des enzymes cellulaires, la polymérase virale pourrait également participer à la polymérisation du brin (+) et ainsi à la synthèse de l'ADNccc. Cette étape de recircularisation, *via* l'achèvement du brin (+) grâce à des topoisomérases cellulaires (Pourquier, Jensen et al. 1999; Bock, Schwinn et al. 2001), permet l'obtention d'un ADNccc fonctionnel témoignant de l'établissement de l'infection (Sun and Nassal 2006).

Le taux d'ADNccc peut varier entre 0,1 à 10 copies par cellule dans le foie des patients chroniquement infectés par HBV (Laras, Koskinas et al. 2006). La demi vie de l'ADNccc est assez controversée mais il pourrait être assez stable, et donc susceptible d'être transmis aux cellules filles pendant la mitose. Ses caractéristiques moléculaires seraient ainsi, en partie, à l'origine de la persistance de l'infection virale (Civitico and Locarnini 1994; Moraleda, Saputelli et al. 1997; Zhang, Zhang et al. 2003).

Contrairement aux autres rétrovirus, l'intégration de l'ADN viral au sein de l'ADN de l'hôte, sous forme de provirus, n'est pas nécessaire à la réplication virale. Cependant, cette intégration peut être retrouvée chez les patients en phase d'infection, aiguë ou chronique, et est fréquemment observée chez les patients atteints d'un cancer hépatique viro-induit. Ces insertions, souvent retrouvées dans des régions transcriptionnelles actives, peuvent en effet déréguler les voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire, l'apoptose et la prolifération (Paterlini-Brechot, Saigo et al. 2003).

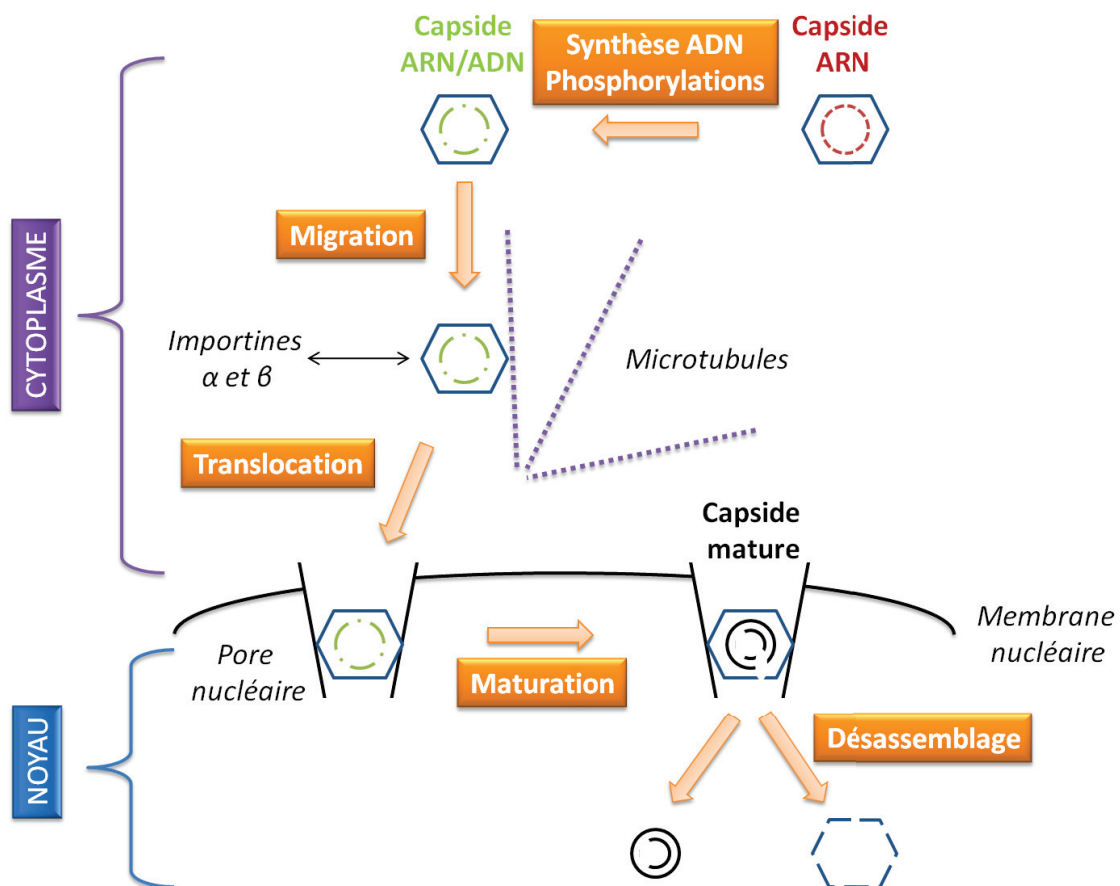


FIGURE 12 : TRANSPORT DE LA NUCLEOCAPSIDE ET DELIVRANCE DU GENOME HBV AU NOYAU

Via le réseau de microtubules, la capside sera acheminée jusqu'au pore nucléaire (NPC). Elle sera prise en charge par l'importine  $\beta$  et son adaptateur l'importine  $\alpha$ , via les séquences NLS de la protéine Core, et pourra transloquer au niveau du NPC. Les capsides immatures seront arrêtées au niveau des NPC pour subir une étape de maturation. En effet, seules les capsides matures (moins stables) pourront se désassembler et libérer l'ADN RC et les dimères de Core dans le noyau des cellules infectées.

### 1.2.5.3 De la transcription de l'ARNpg à la synthèse de l'ADN RC

L'ADNccc sert de matrice à la transcription des cinq ARNs viraux dont l'ARNpg via l'ARN polymérase II cellulaire (Seeger and Mason 2000; Nassal 2008). L'ADNccc est organisé en mini-chromosome grâce à la présence de protéines histones (H3 et H4) et non-histones régissant l'activité transcriptionnelle de la chromatine par des jeux de méthylation/acétylation (Pollicino, Belloni et al. 2006). De nombreux activateurs et répresseurs de la transcription participent ainsi au contrôle épigénétique de l'ADNccc et régulent la réplication virale (Levrero, Pollicino et al. 2009).

Des études récentes ont identifié des facteurs de transcription (CREB, ATF et STAT1/2), des histones acetyl-transferases (CBP, P300 et PCAF) ainsi que des histones deacetylases (HDAC1 et hSirt1) capables de se lier à l'ADNccc pour réguler son activité. La protéine X peut également interagir indirectement avec l'ADNccc, et modifier le statut d'acétylation, de méthylation et de phosphorylation des histones qui lui sont associées, pour contrôler son activité au niveau épigénétique et activer la réplication virale (Pollicino, Belloni et al. 2006; Belloni, Pollicino et al. 2009; Luo, Chen et al. 2013). En interagissant avec DDB1, la protéine X pourrait également participer à la transactivation de l'ADNccc (Leupin, Bontron et al. 2005). Par ailleurs, l'AgHBx pourrait inhiber l'enzyme méthyl-transférase PRMT1 et la phosphatase PP1, toutes deux régulant négativement l'activité de l'ADNccc, et ainsi rétablir la transcription virale (Cougot, Allemand et al. 2012; Benhenda, Ducroux et al. 2013). La protéine Core est également retrouvée associée à l'ADNccc et permet de modifier la conformation spatiale de la chromatine en réduisant les espaces entre les nucléosomes (Bock, Schwinn et al. 2001). La protéine Core pourrait également activer la transcription de l'ADNccc en interagissant avec le promoteur de l'ARNpg au niveau du deuxième îlot CpG de son promoteur (Guo, Li et al. 2011). Par ailleurs, des cytokines antivirales tels l'IL-6 et l'IFN $\alpha$  pourraient également affecter le statut transcriptionnel de l'ADNccc. Plus particulièrement, l'IL-6 pourrait réguler le taux des facteurs hépatiques HNF4 et HNF1, essentiels à l'activité promotrice des promoteurs du HBV (Hosel, Quasdorff et al. 2009). Dans le cas de l'IFN- $\alpha$ , il pourrait se lier au motif ISRE présent sur l' « enhancer I », recruter des histones deacetylases (HDAC1 et hSirt1) induisant l'hypo-acétylation des histones, et des histones méthylases du complexe PRC2 réprimant la transcription des ARNs viraux (Belloni, Allweiss et al. 2012).

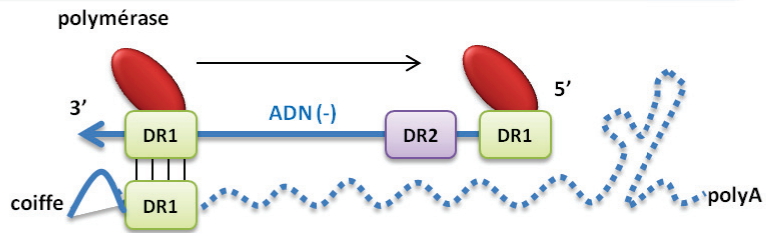
Les ARNs viraux ainsi transcrits à partir de l'ADNccc sont coiffés, polyadénylés au niveau d'un site unique, et exportés dans le cytoplasme où ils seront traduits pour donner les différentes protéines virales. La principale originalité de ce cycle réside dans le fait que ce virus à ADN doit subir une étape de transcription inverse pour répliquer son génome au sein de la capsid en cours de formation. L'ARNpg sera ainsi utilisé comme matrice virale pour la rétrotranscription et la synthèse de l'ADN RC. L'ARN polymérase II ignore le site de polyadénylation lors de sa première rencontre. Par conséquence, l'ARNpg comporte une redondance des motifs DR1 (pour « Direct Repeat 1 ») et  $\epsilon$  (Cherrington, Russnak et al. 1992). De façon synchrone à l'encapsidation, le complexe ARNpg-polymérase se lie de façon covalente à la boucle située au sommet de la structure secondaire  $\epsilon$  (Pollack and Ganem 1993; Pollack and Ganem 1994). Il a été montré que la polymérase virale se liait préférentiellement à la molécule d'ARNpg qui avait été utilisée comme matrice pour sa propre synthèse (Bartenschlager, Junker-Niepmann et al. 1990). Des protéines chaperonnes telles que Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hop, Hsp60 et p23 participeront également au maintien de ce complexe ribo-nucléoprotéique (Beck and Nassal 2007). Le contact entre les domaines TP (motif T3) et RT de la polymérase, induisant un changement conformationnel de cette dernière, serait nécessaire pour son activité enzymatique et sa liaison à l'ARNpg (Cao, Badtke et al. 2005; Stahl, Beck et al. 2007). Particulièrement, un résidu tyrosine au niveau du

domaine TP permettrait la liaison entre la polymérase virale et l'extrémité 5' du brin (-), et induirait l'initiation de la rétrotranscription avec la synthèse de l'amorce (Zoulim and Seeger 1994). Le complexe ARNpg-polymérase-amorce serait ensuite transféré en position 3' de l'ARNpg grâce à sa similarité de séquence avec la région DR1. Ce mécanisme de translocation est encore peu décrit mais il semblerait que des motifs Phi et Omega, complémentaires à  $\epsilon$  et proches de la région DR1 en 3', puissent faciliter la translocation du complexe ARNpg-polymérase-amorce en interagissant ensemble (Tang and McLachlan 2002; Shin, Lee et al. 2004; Abraham and Loeb 2007). L'élongation du brin (-) peut finalement débiter et l'ARNpg est dégradé au fur et à mesure grâce à l'activité RNaseH de la polymérase virale. Seul un oligonucléotide (11 nt) en 5', contenant la région DR1, est épargné et sert ensuite d'amorce pour la synthèse du brin (+) (Nassal 2008). En effet, celui-ci est tout d'abord transloqué en 5' du brin d'ADN néoformé au niveau de la région DR2 (pour « Direct Repeat 2 »), et ceci grâce à la forte homologie de séquence entre DR1 et DR2 (Habig and Loeb 2006). Il y ensuite circularisation du brin (-) grâce à la complémentarité entre les deux séquences DR1 et finalement polymérisation du brin (+). Cette synthèse restera inachevée et aboutira à la formation de l'ADN RC retrouvé dans les nucléocapsides matures. Néanmoins, de l'ADN double brin linéaire peut être produit en cas d'échec lors du transfert d'amorce ARN à la séquence DR2, et ceci par extension à partir de sa position d'origine (figure 13) (Yang and Summers 1998; Nassal 2008).

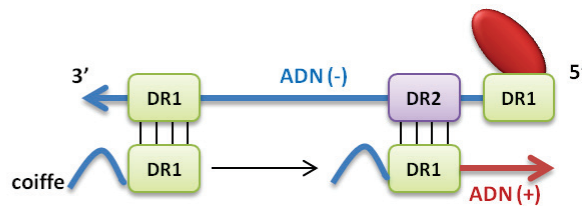
La protéine Core pourrait également jouer un rôle primordial dans la synthèse de l'ADN RC. En effet, la phosphorylation des résidus sérines 155, 162 et 170, par des SRPK kinases et/ou PKC au niveau du domaine CTD de la protéine Core, serait également essentielle à l'étape de rétrotranscription (Liao and Ou 1995; Kann, Sodeik et al. 1999; Daub, Blencke et al. 2002). Des délétions/modifications au sein du domaine CTD inhiberaient ainsi la synthèse de l'ADN RC (Nassal 1992; Kock, Nassal et al. 2004; Le Pogam, Chua et al. 2005). La phosphorylation en position 162 serait également nécessaire et suffisante pour l'encapsidation de l'ARNpg. Par ailleurs, il a été montré que des délétions au niveau de certaines asparagines (mutants « Asp-core ») permettaient la synthèse complète du premier brin d'ADN mais abolissait la synthèse du deuxième brin (Basagoudanavar, Perlman et al. 2007). La protéine Core jouerait ainsi le rôle de chaperonnes en participant à la synthèse de l'ADN RC en fonction du degré de phosphorylation de son domaine CTD (Wang, Dhason et al. 2012). La protéine de capsid aurait également une affinité différente entre les molécules d'ARN simple brin et d'ADN double conférant aux dimères de Core la propriété d'encapsider majoritairement l'ARNpg. Ce phénomène aboutirait à la formation de capsides plus stables que celles contenant l'ADN RC, qui pourront par ailleurs être capable de se désassembler au niveau du noyau pour libérer le génome viral (Rabe, Delaleau et al. 2009; Dhason, Wang et al. 2012). Par ailleurs, la protéine X pourrait également participer à la phosphorylation des résidus sérines de la protéine Core et ainsi exercer un effet régulateur sur la réplication virale (Melegari, Wolf et al. 2005).



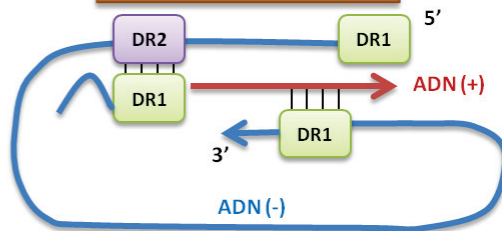
## 1 - Synthèse du brin (-) et dégradation de l'ARNpg



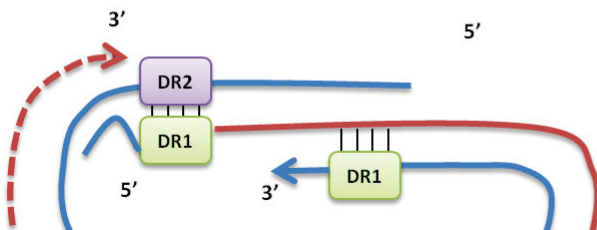
## 2 - Transfert de l'amorce



## 3 - Circularisation



## 4- Synthèse de l'ADN-RC



## 4bis- ADN double brin linéaire

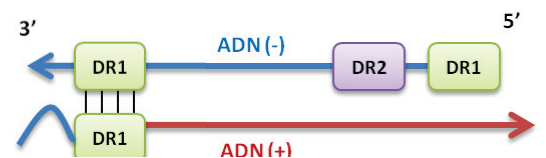


FIGURE 13 : RETRO-TRANSCRIPTION DE L'ARN PREGENOMIQUE ET SYNTHÈSE DE L'ADN RC

(1) Parallèlement à l'encapsidation, la polymérase se lie de façon covalente à l'ARNpg et induit la polymérisation du brin (-) *via* son activité RT, ainsi que la dégradation de l'ARNpg *via* son activité RNaseH. Seul un oligonucléotide (coiffe) sera épargné et servira d'amorce pour la synthèse du brin (+). (2) Cette oligonucléotide contient la séquence DR1 et sera transloqué en 5' du brin d'ADN (-) néosynthétisé au niveau de la région DR2 (forte homologie entre les séquences DR1 et DR2). (3) Il y aura circularisation de l'ADN *via* la complémentarité des deux régions DR1. (4) La synthèse du brin (+) pourra être initiée mais restera inachevée formant ainsi l'ADN RC. (4 bis) En cas d'échec du transfert de l'amorce au niveau de la région DR2, il y a formation d'ADN db linéaire par initiation de la polymérisation de l'ADN (+) au niveau de la séquence DR1.

#### ***1.2.5.4 De la formation des nucléocapsides matures à leur sécrétion ou recyclage***

Parallèlement à la synthèse de l'ADN RC, la maturation de la capsid est associée à une déphosphorylation progressive de la protéine Core (Perlman, Berg et al. 2005; Roseman, Berriman et al. 2005). Les changements conformationnels ainsi induits permettront l'interaction de la nucléocapside néo-synthétisée avec les domaines Prés1 *via* la poche hydrophobe situé près des « spikes » de la protéine Core (Dryden, Wieland et al. 2006; Bruss 2007). Ainsi, les nucléocapsides matures interagiront préférentiellement avec les protéines d'enveloppe enchâssées dans la membrane du RE pour ensuite être excrétées par exocytose *via* la voie endosomale (Gerelsaikhon, Tavis et al. 1996; Wei, Tavis et al. 1996; Perlman and Hu 2003).

Les protéines d'enveloppe S et L sont indispensables à la formation des virions et ceci contrairement à la protéine M (Bruss and Ganem 1991; Le Seyec, Chouteau et al. 1998). En particulier, la conformation i-preS du domaine Prés1 semble essentielle à l'enveloppement des nucléocapsides. En plus de ce domaine, la petite boucle située entre les domaines TM1 et TM2 du côté cytoplasmique pourrait également intervenir dans l'enveloppement de la nucléocapside (Poisson, Severac et al. 1997; Loffler-Mary, Dumortier et al. 2000). En effet, des délétions au sein de ce domaine aboliraient la morphogénèse des virions sans affecter la sécrétion des particules subvirales. En outre, il a été montré que les « spikes » de la protéine Core pouvaient interagir avec la protéine S *via* des interactions électrostatiques, et que leur neutralisation par un peptide prévenait la sécrétion des virions. Ces données témoignent ainsi de l'importance de ce domaine dans la morphogénèse virale (Bottcher, Tsuji et al. 1998; Ponsel and Bruss 2003; Seitz, Urban et al. 2007)

Le mode de sécrétion des virions néoformés est encore mal connu. Les nucléocapsides migreraient jusqu'aux compartiments RE-Golgi et pourraient utiliser les MVBs (pour « multivesicular bodies ») pour bourgeonner, comme décrit dans d'autres familles de virus enveloppés (von Schwedler, Stuchell et al. 2003; Watanabe, Sorensen et al. 2007). L'interaction entre la protéine Core et les protéines VSP4A/B et Alix/AIP1 composantes des MVBs semble être en effet essentielle au bourgeonnement des virions (Bardens, Doring et al. 2011). La voie d'exocytose des particules subvirales et des virions est différente (Patent, Hourieux et al. 2009). En effet, seule la protéine L peut interagir avec l'adaptine gamma2, impliquée dans la voie endosomale précoce de sécrétion des particules virales, et n'est que peu présente sur les particules subvirales (Lambert, Doring et al. 2007).

Les nucléocapsides non enveloppées peuvent également être recyclées dans le noyau pour maintenir/amplifier le nombre de copies d'ADNccc (Tuttleman, Pourcel et al. 1986). Dans le modèle du DHBV, il a été montré que les deux devenir des nucléocapsides étaient régulés par le taux de production de la protéine d'enveloppe L puisque l'absence de cette

dernière entraîne une accumulation d'ADNccc dans le noyau des cellules infectées (Summers, Smith et al. 1990; Lenhoff and Summers 1994). A l'inverse, lorsque le taux d'ADNccc et par conséquent le taux de protéines L sont suffisants, les nucléocapsides sont alors redirigées vers la voie sécrétoire.

## I.3 Les modèles d'études du HBV

L'étude de la physiopathologie de l'infection HBV a longtemps souffert du manque de modèles d'études pertinents pouvant supporter toutes les étapes du cycle de réplication. Du fait de l'étroite spécificité d'hôte du HBV, seuls les hépatocytes primaires humains isolés *in vitro* et les chimpanzés étaient permissifs à l'infection, ce qui rendait l'approche expérimentale difficile. Seule une lignée immortalisée, non transformée et permissive à l'infection HBV a pu être isolée : la lignée HepaRG.

Des alternatives ont été envisagées telles que le développement de modèles *in vitro* issus de lignées d'hépatomes humains transformés, ou encore de modèles *in vivo* à partir d'autres virus phylogénétiquement proches du HBV, tels que les Orthohepadnavirus et Avihépadnavirus. Par ailleurs, d'autres modèles *in vivo* ont fait leur apparition avec l'utilisation de souris transgéniques, chimériques ou humanisés permettant de pallier à la difficulté d'utilisation de certains modèles animaux pour l'étude des Hépadnavirus, et en particulier du virus de l'hépatite B (Dandri, Lutgehetmann et al. 2013).

### I.3.1 Les modèles acellulaires

La polymérase est une enzyme clef de la réplication virale et par conséquent une cible thérapeutique intéressante pour la mise au point de composés antiviraux (Zoulim and Locarnini 2009). Cependant, sa structure n'est toujours pas connue à l'heure actuelle ce qui freine considérablement le développement de molécules inhibitrices. Ainsi, des systèmes acellulaires ont été mis au point pour étudier son activité enzymatique et tester l'action des inhibiteurs de la polymérase virale tels les analogues de nucléos(t)ides.

Dans un système d'expression en cellules d'insectes *via* un baculovirus recombinant, il a été montré que la polymérase pouvait s'associer au brin (-) de l'ADN HBV (Lanford, Notvall et al. 1995). De plus, ce système a aussi été utilisé pour tester l'impact de l'Adéfovir sur des polymérases résistantes aux traitements Lamivudine en comparant les constantes d'inhibition des polymérases sauvages et mutantes vis-à-vis de chacun de ces deux analogues de nucléos(t)ides (Xiong, Flores et al. 1998).



Plus récemment, un système basé sur l'utilisation de la polymérase virale endogène contenue dans des nucléocapsides purifiées sur gradient a également été développé. Celles-ci ont ainsi été utilisées pour tester l'activité de certains inhibiteurs, et notamment l'impact de certaines substitutions nucléotidiques sur l'efficacité d'une thérapie à base d'Entécavir (Tenney, Levine et al. 2004; Walsh, Langley et al. 2010).

Cependant, si des résultats sur les antiviraux ont pu être obtenus à partir de modèles biochimiques acellulaires, il est important de tenir compte du métabolisme des analogues de nucléos(t)ides au sein de l'hépatocyte infecté et donc d'avoir recours aux modèles cellulaires quand ces derniers sont disponibles. De plus, pour étudier les étapes de formation de l'ADN RC, il est également préférable de se positionner dans un contexte plus physiologique avec l'utilisation de modèles *in vitro* infectables, permettant un cycle de réplication viral complet et l'interaction putative avec des protéines de l'hôte.

## I.3.2 Les modèles cellulaires

### I.3.2.1 Les lignées d'hépatome

Pour pallier aux difficultés liées aux cultures d'hépatocytes primaires, des lignées cellulaires issues d'hépatomes (HepG2, HuH7...) sont à l'heure actuelle couramment utilisées (figure 14). Cependant, ces cellules ont perdu leur capacité à pouvoir être infectée par HBV pendant leur processus de cancérisation. Des systèmes utilisant des méthodes de transduction ou transfection (stable ou transitoire) du génome HBV ont donc été mis en place pour pallier à ce manque de permissivité, et ainsi contourner l'étape d'entrée. Il faut cependant noter que de nombreuses voies de signalisation sont dérégulées dans les cellules transformées, et que ces différents modèles ne peuvent pas être utilisés pour toutes les thématiques de recherche.

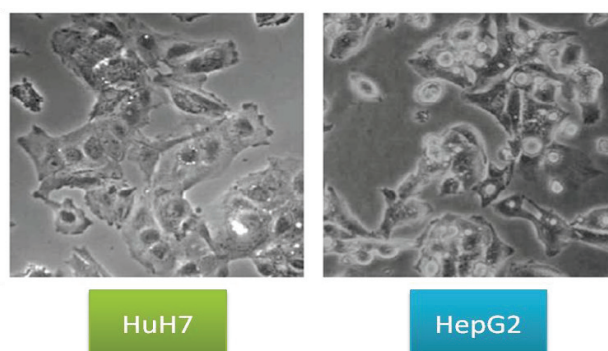


FIGURE 14 : OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE CELLULES D'HEPATOME HUH7 ET HEPG2 (MICROSCOPE OPTIQUE)

- **Les transfections/transductions transitoires :**

Tout d'abord, une approche « sans vecteur » a été développée. Elle consiste à transfecter dans des cellules d'hépatome des produits PCR HBV préalablement digérés par des enzymes de restriction. Ceux-ci pourront se recirculariser grâce aux enzymes de la cellule hôte et ainsi servir de matrice à la transcription des ARNs viraux. Même si les niveaux de réplication obtenus restent modérés, ce modèle a notamment permis d'étudier l'impact des modifications épigénétiques du virus sur la régulation de l'ADNccc (Pollicino, Belloni et al. 2006; Belloni, Allweiss et al. 2012).

Il est également possible d'utiliser des vecteurs plasmidiques (transfection) ou baculoviraux/adénoviraux (transduction) pour délivrer de façon efficace le génome HBV dans des cellules d'hépatomes. Dans une infection *in vivo*, l'ARNpg transcrit à partir de l'ADNccc a une taille équivalente à 1.1 unité génomique. Dans tous les cas, il faudra donc insérer au moins 1.1 unité de génome HBV dans les vecteurs de transfection/transduction pour que l'intégrité génétique de l'ARNpg soit conservée. La synthèse de l'ARNpg peut rester sous le contrôle des promoteurs naturels HBV (cas des insertions supérieures à 1.3 unité génomique) ou être initiée par un promoteur fort hétérologue (cas des vecteurs contenant 1.1 unité génomique) (Lucifora, Durantel et al. 2008).

Les systèmes de transfection ont permis d'effectuer des analyses fonctionnelles pour déterminer le rôle des protéines HBV dans le cycle de réplication virale (Seeger and Mason 2000), mais aussi des essais phénotypiques sur des souches HBV mutantes sélectionnées lors des thérapies *in vivo* (Durantel, Carrouee-Durantel et al. 2004; Durantel, Brunelle et al. 2005).

Les vecteurs baculoviraux et adénoviraux possèdent la caractéristique de ne pas être cytopathique et de pouvoir tolérer de larges insertions d'ADN étranger, ce qui leur confèrent la caractéristique d'être d'excellents vecteurs (Rauschhuber, Noske et al. 2012; Airene, Hu et al. 2013). Ils représentent ainsi une bonne alternative aux systèmes de transfection moins efficaces en termes d'intensité de réplication et de reproductibilité. De part leur large spécificité d'hôte, ils permettent finalement de s'affranchir des contraintes expérimentales imposées par les transfections plasmidiques (stade du cycle cellulaire, permissivité de chaque type cellulaire à la transfection...), et de délivrer efficacement le génome HBV dans des cellules hépatocytaires quiescentes (cellules HepaRG différenciées, hépatocytes primaires...) (Lucifora, Durantel et al. 2010; Lucifora, Vincent et al. 2010), mais également dans des modèles animaux non permissifs à l'infection HBV (Huang, Gabel et al. 2012).

- **Les transfections stables :**

Pour obtenir des résultats plus reproductibles, des lignées stables exprimant le génome HBV, de façon constitutive ou inducible, ont été construites à partir de cellules d'hépatomes. Nous pouvons citer notamment la lignée HepG2.2.15 issue de la transfection stable de cellules HepG2 qui produit constitutivement des virions HBV

(Sells, Chen et al. 1987; Sells, Zelent et al. 1988). En plus d'être un modèle *in vitro* souvent utilisé pour des études fonctionnelles et phénotypiques, cette lignée est souvent utilisée dans les laboratoires de recherche pour produire d'importants stocks de virions infectieux. Différentes lignées exprimant de façon constitutive des souches HBV mutantes ont également été créées afin d'étudier leur résistance aux antiviraux (Billioud, Pichoud et al. 2012). L'un des inconvénients majeurs de ces lignées stables réside dans le fait, qu'en plus des étapes d'entrée abolies, le début de la réplication ne peut pas être contrôlé puisque ces cellules produisent continuellement du virus. Des lignées stables exprimant HBV de façon inducible sous le contrôle de la tétracycline à partir d'HepAD38, HepG2 et HuH7 ont donc été mises en place (Ladner, Otto et al. 1997; Sun and Nassal 2006). Outre leur utilité pour le test de nouveaux antiviraux, ces lignées inducibles permettent aussi d'étudier les relations virus-cellules lors de la réplication HBV (Christen, Duong et al. 2007). Finalement, grâce à la découverte récente du récepteur du virus HBV, des lignées d'hépatomes jusqu'à présent non permissives à l'infection HBV pourront être génétiquement modifiées et ainsi exprimer le transgène NTCP, afin de supporter un cycle de réplication complet permettant d'étudier les étapes précoces d'entrée en particulier (Yan, Zhong et al. 2012).

### ***1.3.2.2 La lignée cellulaire HepaRG***

En 2002, une lignée de cellules hépatiques humaines immortalisées mais non transformées, appelée HepaRG, a été obtenue à partir d'un foie de patient atteint d'un CHC (Gripon, Rumin et al. 2002). C'est une lignée progénitrice qui peut se différencier en deux types cellulaires distincts : les cellules hépatocytaires et les cellules biliaires (figure 15) (Parent, Marion et al. 2004). En présence de DMSO, les cellules hépatocytaires montrent des propriétés similaires à celle des hépatocytes primaires humains en exprimant la plupart des marqueurs hépatiques, dont le récepteur NTCP, et conservent ainsi leur permissivité à l'infection HBV (Gripon, Rumin et al. 2002; Yan, Zhong et al. 2012). Ainsi cette lignée représente un outil précieux pour évaluer de nouvelles stratégies antivirales et étudier le cycle viral dans un réel contexte d'infection, contrairement aux cellules d'hépatome (Hantz, Parent et al. 2009; Marion, Hantz et al. 2010).

Même si cette lignée constitue le modèle *in vitro* le plus proche des hépatocytes primaires humains, avec l'avantage d'être plus facilement manipulable et accessible, son infection reste cependant peu efficace puisque seulement 5 à 10% des cellules sont infectées et la réplication, détectable 6 à 8 jours post-infection, reste assez faible même si elle persiste dans le temps (100 jours) (Hantz, Parent et al. 2009). La polarisation des hépatocytes issus de la différenciation de la lignée HepaRG n'est pas optimale, en comparaison avec celle des hépatocytes primaires humains, ce qui pourrait expliquer, en partie, son faible taux d'infection (Schulze, Mills et al. 2012).

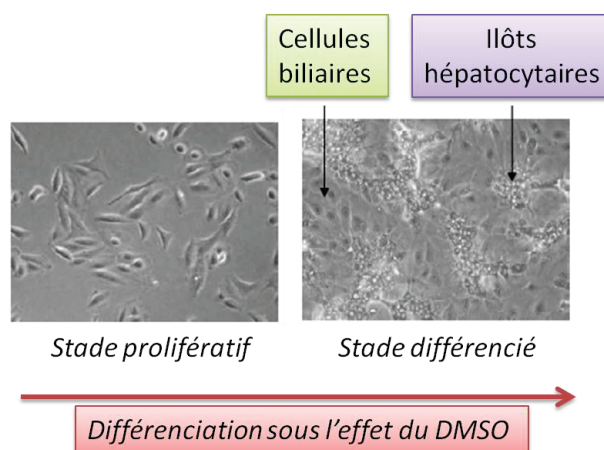


FIGURE 15 : OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES HEPARG (MICROSCOPE OPTIQUE)

### 1.3.2.3 Les hépatocytes primaires humains

Le modèle *in vitro* le plus pertinent à l'heure actuelle pour étudier le virus de l'hépatite B reste l'infection d'hépatocytes primaires humains ou PHH (figure 16). En effet, en étant maintenues plusieurs semaines en culture en présence de DMSO (Gripon, Diot et al. 1988), 100% des cellules peuvent être infectées et supportées un cycle complet de réplication (Schulze, Mills et al. 2012). Cependant, en plus de leur difficulté de culture et de préparation, ces cellules sont issues de zones saines de morceau de foie prélevé sur des patients atteints de cancers gastriques ce qui les rend difficile d'accès (Lecluyse and Alexandre 2010).

Ainsi, les cultures primaires d'hépatocytes d'animaux tels le canard de Pékin, la marmotte américaine ou encore le tupaïa belangeri peuvent représenter une alternative à l'utilisation des PHH (Walter, Keist et al. 1996). Ils permettent également une réplication complète du virus de l'hépatite B qui leur est associé : respectivement le DHBV, le WHV et le HBV. Bien que plus répandues que les cultures d'hépatocytes primaires humains, l'accès aux cultures d'hépatocytes primaires animaux reste toutefois limité à des laboratoires de recherche associés à des centres vétérinaires, et contrôlé par des règles éthiques.



FIGURE 16 : OBSERVATION MICROSCOPIQUE D'HEPATOCYTES PRIMAIRES HUMAINS *IN VITRO* (MICROSCOPE OPTIQUE)

### I.3.3 Les modèles animaux

La découverte de modèles animaux infectables par HBV (chimpanzé, tupaïa) et de modèles de substitution (WHV, DHBV, etc.), ainsi que la création de souris transgéniques/chimériques/humanisées capables de répliquer le virus HBV, ont permis des avancées significatives dans le domaine de l'immunopathogénèse de l'infection HBV, et dans la compréhension du développement viro-induit du CHC. Ces modèles animaux ont également permis l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques et prophylactiques (figure 17) (Dandri, Lutgehetmann et al. 2013).

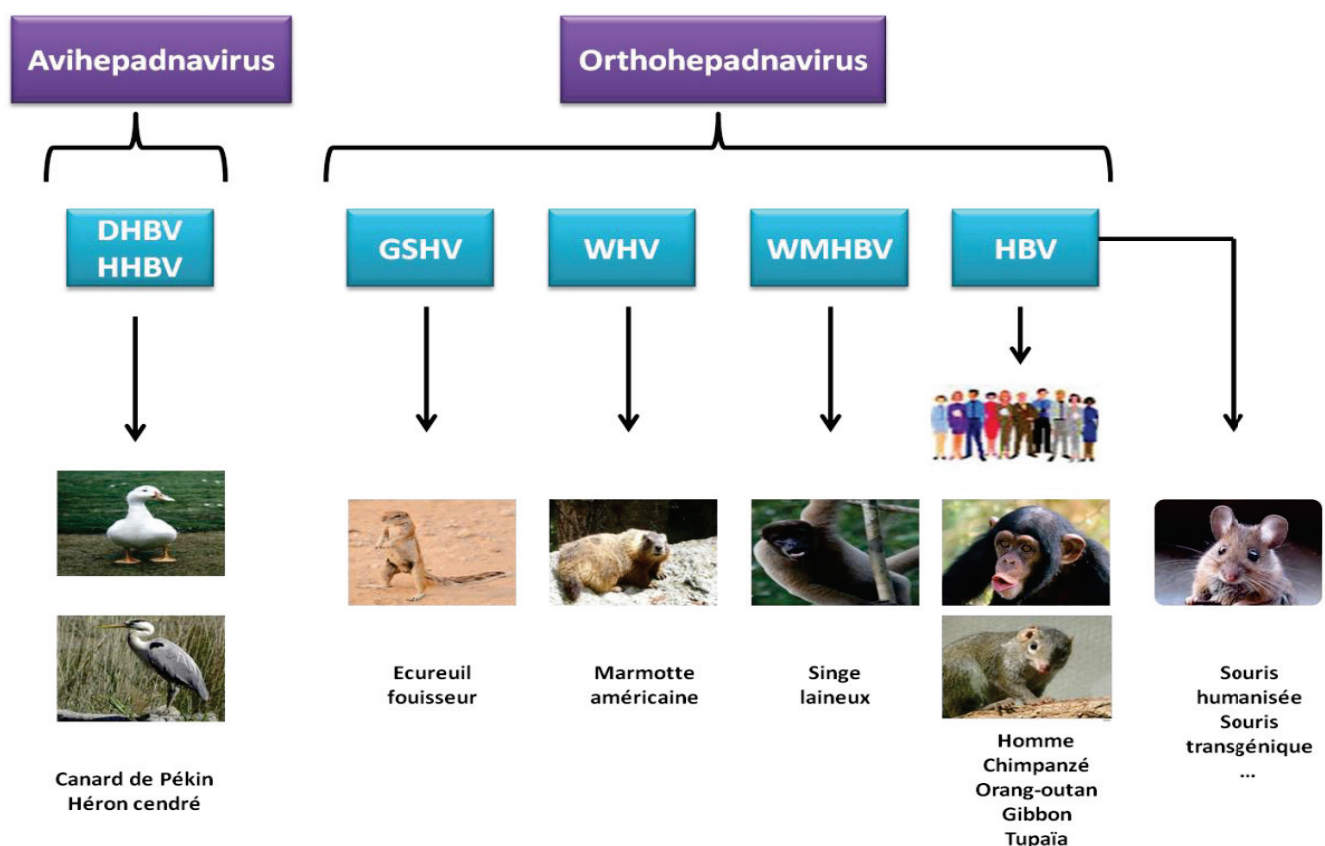


FIGURE 17 : LES DIFFERENTS MODELES ANIMAUX SUCEPTIBLES A L'INFECTION PAR LES HEPADNAVIRIDAE

#### I.3.3.1 Les primates

Du point de vue phylogénétique, les grands primates sont les plus proches parents de l'homme et représentent donc des modèles d'études pertinents pour étudier la biologie du virus HBV (Grethe, Heckel et al. 2000).

Le chimpanzé (*Pan troglodytes*) est le premier animal à avoir prouvé sa susceptibilité au HBV en développant une infection aiguë après injection de *sera* provenant de patients

contaminés (Barker, Chisari et al. 1973). Il fait partie des modèles simiens permissifs à l'infection HBV ayant permis de grandes avancées dans le domaine, malgré sa faible disponibilité (coût, éthique). L'inoculation des chimpanzés avec du sérum contaminé par HBV entraîne dès lors l'établissement d'une infection aiguë asymptomatique, similaire à celle observée chez l'homme (Bertoni, Sette et al. 1998). On peut en effet observer l'apparition d'AgHBs suivie de la détection des anticorps anti-HBe et anti-HBc dans les *séras* (Barker, Maynard et al. 1975). L'implication du système immunitaire dans la clairance virale ainsi que l'efficacité et l'innocuité de nouvelles stratégies vaccinales anti-HBV ont pu être déterminées grâce au modèle chimpanzé (Guidotti, Rochford et al. 1999; Pancholi, Lee et al. 2001; Murray, Wieland et al. 2005; Asabe, Wieland et al. 2009; Kamili, Sozzi et al. 2009). Cependant, l'infection de ce primate ne conduit pas à l'établissement d'une infection chronique. Il demeure donc impossible d'étudier la physiopathologie de l'infection HBV à des stades cirrhotiques ou de CHC.

Par ailleurs, différentes équipes ont montré que d'autres singes comme le gibbon (Sall, Starkman et al. 2005), l'orang-outan (Verschoor, Warren et al. 2001), ou encore le singe laineux (Lanford, Chavez et al. 1998) pouvaient constituer des modèles d'études du HBV. Cependant, aucun de ces travaux ne fait mention d'élévation de l'alanine amino-transférase (ALAT) dans le sérum, ou de développement de lésions hépatiques. Des travaux sur le macaque ont montré l'établissement d'une infection similaire à l'infection aiguë chez l'homme, suite à la transfection ou transduction d'un vecteur exprimant le virus HBV au niveau intrahépatique (Gheit, Sekkat et al. 2002; Lucifora, Vincent et al. 2010). Plus récemment, il a été montré que le macaque pourrait également être susceptible à l'infection HBV ce qui en fait un modèle expérimental prometteur, plus accessible et moins onéreux que le chimpanzé (Dupinay, Gheit et al. 2013).

Finalement, il existe un petit mammifère phylogénétiquement proche des primates et susceptible à l'infection par HBV *in vitro* et *in vivo* : le tupaïa *belangeri* (Walter, Keist et al. 1996). Il développe une hépatite aiguë similaire à celle observée chez l'homme avec disparition rapide de l'AgHBs du sérum et séroconversion des anticorps anti-HBe et anti-HBs. Ce modèle est utilisé pour étudier les étapes précoces de l'infection virale et particulièrement la phase d'absorption du virus (Glebe, Urban et al. 2005; Meier, Mehrle et al. 2012). Le tupaïa est également intéressant pour étudier les mécanismes de pathogénèse puisque suite à l'infection, cet animal peut développer un carcinome hépatocellulaire (Li, Wan et al. 2008). Cet animal reste cependant peu utilisé car malgré sa petite taille, sa permissivité au virus HBV et son faible coût, il pose de nombreux problèmes d'élevage.

### ***1.3.3.2 Les mammifères non-primates***

Même si, comme explicité précédemment, des modèles animaux permissifs au HBV sont disponibles, ils restent cependant difficiles à utiliser en raison de contraintes éthiques



et financières importantes. Ainsi, d'autres modèles d'étude *in vivo* sont utilisés malgré leur divergence par rapport au modèle HBV humain.

La marmotte américaine (*Marmota monax*) infectée par le WHV (pour « Woodchuck hepatitis virus »), virus appartenant aux *orthohepadnavirus*, représente ainsi un modèle classiquement utilisé pour étudier l'immunopathogénèse et l'hépatocarcinogénèse viro-induites. En effet, le virus de l'hépatite B de la marmotte possède une organisation génomique proche du HBV (Hantz, Allaudeen et al. 1984) et conduit à une hépatite chronique active et au développement d'un CHC (Menne and Cote 2007). De plus, les réponses immunitaires induites lors de l'infection, chronique ou aiguë, chez la marmotte sont similaires à celles développées chez l'homme (Fletcher, Chin et al. 2013). Ainsi, ce modèle a ainsi permis d'élucider des mécanismes moléculaires impliqués dans la clairance virale et l'émergence de virus mutants résistants associés au traitement par un analogue de nucléoside (Summers and Mason 2004). Le WHV a également permis de mettre en évidence l'implication de la protéine X dans l'établissement de la réplication virale (Zoulim, Saputelli et al. 1994). D'une manière intéressante, la marmotte américaine infectée par le WHV représente un modèle unique de CHC viro-induit, similaire à l'oncogénèse hépatique associée à l'infection HBV chez l'homme, même si celle-ci ne développe jamais de cirrhose (Andrisani 2013). Plus particulièrement, le mécanisme d'intégration du WHV dans les gènes de la famille c-Myc aboutissant à la tumorigénèse est totalement spécifique à ce modèle (Menne and Cote 2007). Toutefois, la marmotte est difficile à manipuler en raison de sa période d'hibernation de plusieurs mois, et seules les marmottes d'une certaine région d'Amérique du nord sont sensibles à l'infection ce qui en fait un modèle onéreux.

### ***1.3.3.3 Le canard de pékin***

Plus éloigné phylogénétiquement des *orthohepadnavirus* (40% d'homologie), la famille des *avihepadnavirus* reste fréquemment utilisée pour comprendre la biologie du virus HBV. Le DHBV (pour « Duck Hepatitis B Virus ») a été découvert dans les années 1980 et infecte le canard de Pékin (Omata, Uchiumi et al. 1983). Il peut induire, selon l'âge de l'animal et la dose infectieuse utilisée, soit une infection aiguë soit une infection chronique (Cova and Zoulim 2004). Cependant, il n'existe pas d'atteintes significatives du foie malgré le fait que tous les hépatocytes soient infectés (Marion, Knight et al. 1984). L'élucidation des étapes clés de la réplication du HBV, l'identification des cibles antivirales, l'étude des interactions avec la cellule hôte et l'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques des hépatites B chroniques a été possible en grande partie grâce au modèle du DHBV (Cova and Zoulim 2004; Foster, Miller et al. 2005). En effet, ce modèle a permis de comprendre certaines étapes de réplication des hépadnavirus comme la stratégie de réplication utilisant la reverse transcriptase virale (Mason, Aldrich et al. 1982; Summers and Mason 1982), la structure moléculaire de l'ADNccc, les mécanismes conduisant à son amplification ainsi que

la compréhension de son rôle de matrice pour la transcription virale (Funk, Mhamdi et al. 2007).

#### ***1.3.3.4 La souris***

Le modèle d'étude *in vivo* le plus accessible reste finalement la souris. Cependant, à cause de l'étroite spécificité d'hôte du virus, la souris n'est pas susceptible à l'infection HBV.

Ainsi, l'immunopathologie de l'infection HBV a pu être étudiée en partie grâce au modèle de souris transgénique exprimant partiellement ou dans son ensemble le génome viral (Chisari, Pinkert et al. 1985; Chisari 1989). Plus particulièrement, ces modèles transgéniques ont contribué à l'étude de la réponse immunitaire T cytotoxique et humorale ainsi qu'à l'étude du rôle des cytokines (Dandri, Lutgehetmann et al. 2006; Guidotti and Chisari 2006). Ces modèles transgéniques ont également permis d'étudier des stratégies antivirales à base d'analogues de nucléosides, de siRNA et de cytokines inflammatoires (Julander, Colonno et al. 2003; Klein, Bock et al. 2003; Wieland, Vega et al. 2003; Ebert, Poeck et al. 2011). Cependant, ces modèles murins ne présentent pas un cycle viral complet et par conséquent les travaux sur l'entrée, la persistance et la régulation de l'ADNccc demeurent impossibles. De plus, ce modèle animal ne développe pas d'inflammation hépatique du fait de l'établissement d'un mécanisme de tolérance pour les gènes viraux.

D'autres techniques de délivrance du génome HBV ont également été développées. Les souris infectées suite à l'injection intrahépatique d'ADN viral nu n'ont pas été un réel succès du fait du nombre faible d'hépatocytes transfectés, se traduisant par une réplication relativement faible (Feitelson, DeTolla et al. 1988; Yang, Althage et al. 2002). Une amélioration de la technique d'injection dite « hydrodynamique » basée sur l'injection rapide d'ADN plasmidique, au niveau de la queue de la souris, a permis d'augmenter l'efficacité de transfection des hépatocytes murins (Yang, Althage et al. 2002). Cette technique a permis d'étudier l'implication de la réponse adaptative dans le contrôle de l'infection ainsi que le rôle antiviral de divers siRNA dirigés contre HBV (McCaffrey, Nakai et al. 2003). Cependant, la virémie de ces souris chute brutalement à 7 jours et par conséquent l'étude de la persistance virale est impossible dans ce modèle.

Finalement, les modèles de souris chimériques humanisées (souris trimera, souris SCID, souris uPA, souris FRG), basées sur la transplantation de cellules permissives au HBV (hépatocytes primaires humains, hépatocytes primaires de Tupaïa...) dans des souris hôtes, représentent des modèles prometteurs d'étude du virus HBV chez la souris (Dandri, Lutgehetmann et al. 2013).

Les souris trimera sont des souris normales (Balb/c) dont la moelle osseuse a été totalement détruite par irradiation, puis reconstituée à l'aide de cellules issues de moelle



osseuse de souris SCID. Dans ce cas là, l'infection des hépatocytes primaires humains est réalisée ex-vivo avant leur transplantation (Ilan, Burakova et al. 1999). Ce système a une efficacité avoisinant les 80% mais la virémie reste relativement faible et chute à partir de trois semaines environ. Cette période d'infection reste tout de même suffisante pour tester l'efficacité de composés antiviraux (Dandri, Lutgehetmann et al. 2006).

Par ailleurs, des transplantations d'hépatocytes associés à un matrigel ont été mises au point dans des souris SCID pour augmenter la durée d' « engraftment » des hépatocytes hétérologues, et réaliser des infections *in vivo* par inoculation des souris transplantées. Ceci a permis de démontrer la possibilité d'obtenir des lignées de souris produisant du HBV pendant une longue période (environ cinq mois).

Par ailleurs, les souris uPA obtenues par croisement de souris immunodéficientes et de souris exprimant l'urokinase plasminogène activator (ou uPA), toxique pour le foie, sont également utilisées pour la transplantation hépatique (Rhim, Sandgren et al. 1994). Ainsi, après destruction hépatique, le foie des souris uPA est repeuplé *via* une greffe d'hépatocytes. Des analyses immunohistochimiques et des études de microscopie ont permis de mettre en évidence la formation de canalicules entre les hépatocytes murins et hétérologues, ainsi que la persistance des marqueurs hépatocytaires humains après la greffe. Ce modèle permet d'étudier le fitness et la propagation des variants HBV, l'impact des nouveaux traitements sur la réplication virale, mais aussi l'immunopathogénèse après transfert de cellules immunitaires humaines dans ces souris immunodéficientes (Dandri, Burda et al. 2005; Lutgehetmann, Mancke et al. 2012). Le principal défaut de ce modèle est la faible viabilité de ces souris du fait de leur fragilité, de la fréquence importante de réversion du transgène et de la létalité de l'homozygotie uPA.

Ainsi, plus récemment, un nouveau modèle murin a été mis en place à partir des souris transgéniques FRG déficientes pour l'enzyme hépatique fumarylacetoacetate hydrolase (FAH), la protéine RAG2 et la chaîne gamma du récepteur IL-2 (figure 18) (Azuma, Paulk et al. 2007; Bissig, Le et al. 2007). La déficience de l'enzyme FAH entraîne une accumulation de composés toxiques dans le foie, létale pour la souris, pouvant être reversée par l'administration orale de NTCB (Grompe, al-Dhalimy et al. 1993; Grompe, Lindstedt et al. 1995). Comme pour le modèle uPA, la xénogreffe des souris FRG est rendu possible de part leur immunodéficience prévenant d'une réponse immunitaire à l'encontre des hépatocytes primaires hétérologues. Ainsi, après la greffe d'hépatocytes humains et suppression de la drogue, une sélection positive de ces hépatocytes peut avoir lieu, ce qui permet d'obtenir, dans les meilleures conditions, un foie composé jusqu'à 95% d'hépatocytes humains infectables par HBV et HCV (Bissig, Wieland et al. 2010). Plus particulièrement, le niveau de greffe est évalué par rapport au taux d'albumine humaine circulant dans le sang (Dandri and Petersen 2012). Le modèle FRG tend ainsi à supplanter le modèle uPA de part sa fiabilité et sa viabilité. Par ailleurs, la déficience enzymatique de la FAH est le résultat d'une délétion

dans le génome murin ce qui rend impossible toute réversion. Même si l'approvisionnement en hépatocytes primaires humains représente encore la difficulté majeure, ce modèle reste particulièrement intéressant pour l'étude de l'infection HBV et pour l'évaluation de nouvelles thérapies.

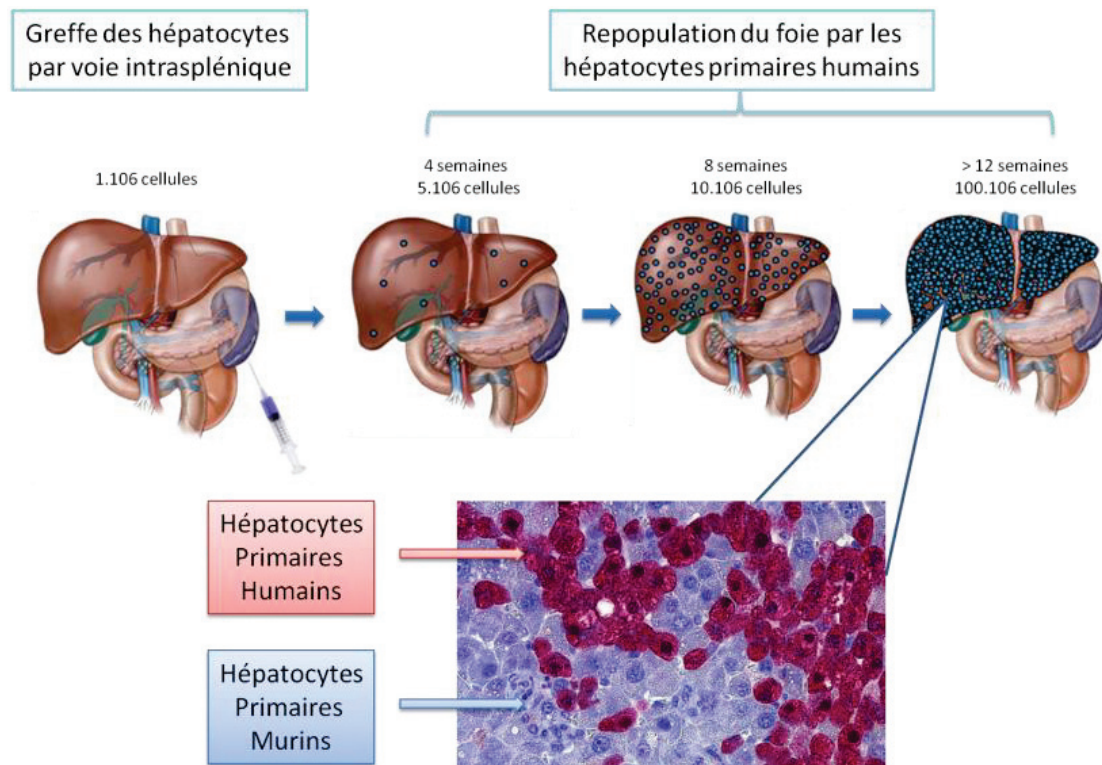


FIGURE 18 : PRINCIPE DE LA GREFFE HEPATOCYTAIRE AU SEIN DU MODELE MURIN FRG

Suivant la greffe des hépatocytes hétérologues et la suppression de la drogue NTCB, une sélection positive des hépatocytes greffés au sein du modèle FRG (déficient pour l'enzyme hépatique FAH) peut avoir lieu, ce qui permet une repopulation d'environ 95% (100.106 cellules) au-delà de 12 semaines post-greffe. Le marquage en Immuno-histochimie permet de mettre en évidence le taux de repopulation du foie des souris greffés (marquage anti-FAH humaine en violet).

# II-HISTOIRE NATURELLE DE L'INFECTION PAR LE VIRUS HBV

## II.1 La physiopathologie

Les manifestations cliniques et les dommages hépatiques observés suite une infection par HBV varient énormément selon les individus, allant de l'hépatite asymptomatique à l'apparition d'hépatites aiguës ictériques, voir fulminantes. Le devenir de la maladie est lié aux interactions entre le système immunitaire et le virus, et dépend ainsi de l'âge et du statut immunitaire du patient. En effet, dans plus de 90 % des cas, les adultes infectés par HBV développent une hépatite aiguë (souvent asymptomatique) et sont capables de contrôler et éliminer le virus sans effet indésirable à long-terme. Or dans 10% des cas, et pour des raisons encore mal comprises, certains adultes ne parvenant pas à combattre l'infection développent une infection chronique pouvant évoluer à long terme en cirrhose et/ou carcinome hépatocellulaire (CHC) (Chemin and Zoulim 2009). Moins de 1% des patients infectés par HBV développent une hépatite fulminante qui conduit à leur décès en absence de transplantation hépatique. A l'inverse, chez l'enfant et les adultes immunodéprimés, les risques de développer une hépatite chronique s'élèvent à 80% ce qui témoignent de l'importance de la réponse immunitaire et des relations virus/hôte dans le contrôle de l'infection (Rehermann and Nascimbeni 2005; Liaw and Chu 2009; Dandri and Locarnini 2012).

### II.1.1 L'infection aiguë

Après avoir été infecté par HBV, la période d'incubation accompagnée de la montée virémique dure entre 45 et 180 jours, avant l'apparition des symptômes cliniques, et correspond à la première phase de l'infection appelée hépatite aiguë. Dans 90% des cas, les patients évolueront vers la guérison. L'intensité des symptômes d'une infection aiguë varie d'un individu à l'autre et dans 75% des cas d'exposition au virus, l'infection aiguë est asymptomatique et n'est, par conséquent, pas diagnostiquée. Dans les autres cas, les patients développeront des symptômes non-spécifiques de type nausées, asthénie, anorexie, fièvre, arthralgie et urticaire (McMahon, Alward et al. 1985). Le taux des alanine-amino-transaminases (ALAT, enzymes prédominantes dans le foie) est également très élevé (jusqu'à 30 fois supérieure à la normale) en raison d'une forte inflammation du foie, suivie d'une cytolysé hépatique. Le virus HBV n'est pas cytopathique *per se*. Ainsi, les cas symptomatiques observés sont la résultante d'une réponse immune inadaptée médiée par les lymphocytes T cytotoxiques. En effet, la lyse des hépatocytes infectés par les lymphocytes T CD8+ est le mécanisme majeur permettant le contrôle de l'infection mais

engendrant également les dommages hépatiques (Thimme, Wieland et al. 2003). Dans les cas d'hépatite fulminante, survenant dans 1% des cas d'hépatite aigüe, on observe une nécrose du parenchyme hépatique à l'origine d'insuffisance hépatocellulaire. Ces cas sont le plus souvent rencontrés lors de coïnfection avec d'autres virus hépatotropes tel le virus de l'hépatite delta (HDV) (Farci and Niro 2012).

Dans le cas des guérisons durables associées à une réponse immunitaire CD4+ et CD8+ efficace et pluri-épitopique (Murray, Wieland et al. 2005), les cliniciens observent la diminution de l'AgHBs qui coïncide avec l'apparition d'anticorps anti-HBs protecteurs. Dès la disparition de l'AgHBs, les anticorps anti-HBs sont détectés entre 1 à 6 mois et persistent à un taux protecteur durant plusieurs années. A l'inverse, une inflammation persistante incapable de contrôler l'infection, associée à la persistance de l'AgHBs au-delà de 6 mois d'infection, témoignerait de l'évolution de la pathologie vers la chronicité. L'ADN viral reste constamment détectable dans le sérum des patients au cours de l'hépatite aigüe, de même que l'AgHBe qui disparaîtra en même temps que l'apparition des anticorps anti-HBe qui lui sont associés. Tout comme l'AgHBs, la présence de l'AgHBe au-delà de 6 mois d'infection pourrait être le témoin de l'avènement d'une hépatite chronique. Quant aux anticorps anti-HBc, ils apparaissent dès le début de la symptomatologie et persistent pendant l'infection aigüe et même au delà de la guérison. Ils peuvent être utilisés comme marqueur sérique pour affirmer le caractère récent de l'infection selon leur isotype (type IgM ou IgG) (figure 19).

Par ailleurs, dans de rares cas, le virus HBV continu à se répliquer à bas bruit et de façon indétectable dans les hépatocytes même après disparition de l'AgHBs du sérum, ce qui définit l'infection occulte (Raimondo, Caccamo et al. 2013). Elle peut ainsi être à l'origine de réactivation suivant une période d'immunosuppression (chimiothérapie, transplantation..).

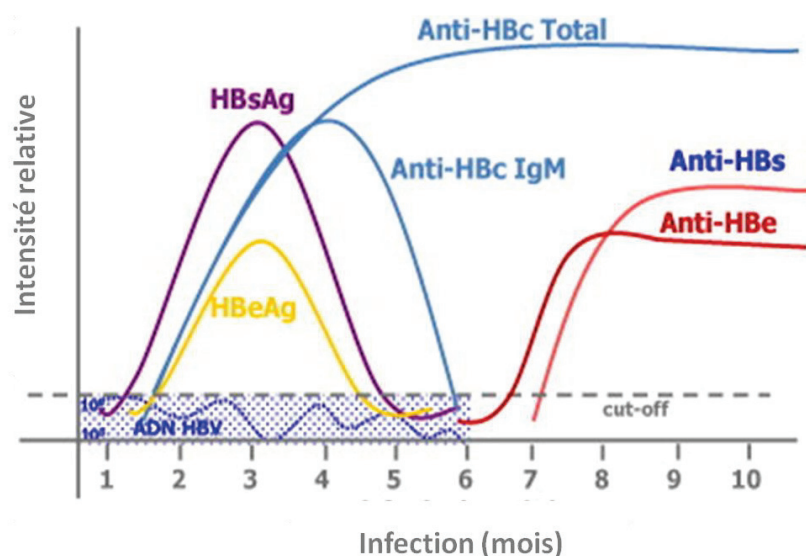


FIGURE 19 : L'HEPATITE B AIGÜE (DENY AND ZOULIM 2010)

## II.1.2 L'infection chronique

Les cliniciens considèrent que l'infection HBV devient chronique lorsque l'AgHBs, l'AgHBe et l'ADN viral restent détectables chez le patient 6 mois suivant l'infection. L'évolution vers la chronicité dépend de l'interaction entre les facteurs viraux et les facteurs de l'hôte, tel le statut immunitaire de l'individu.

Ainsi, l'âge de l'infection est, par exemple, déterminant puisque le passage à la chronicité est observé chez 90% des enfants nés de mères infectées, en l'absence d'immuno-prophylaxie (active ou passive) lors de l'accouchement. Le fœtus pourrait en effet développer une immunotolérance aux antigènes viraux expliquant la forte prévalence des hépatites chroniques chez ces sujets (Milich and Liang 2003). L'avènement d'une hépatite chronique survient également chez 25% des enfants contaminés avant l'âge de 5 ans, chez environ 10% des adultes immunocompétents, chez 30% des adultes âgés de 50 ans et plus, et finalement chez 100% des sujets immunodéprimés. D'autres facteurs de l'hôte pourraient également être prédictifs du passage à la chronicité comme certains facteurs immunogénétiques. Des polymorphismes prédictifs de l'évolution de la maladie ont ainsi été identifiés au niveau du système HLA : DR4 et DR13 favoriseraient ainsi la clairance virale, alors que DR3 favoriserait d'avantage la persistance virale (Yan, Fan et al. 2012). Par ailleurs, les facteurs viraux tels que le génotype pourraient également influencer la progression de la maladie (Lin and Kao 2011).

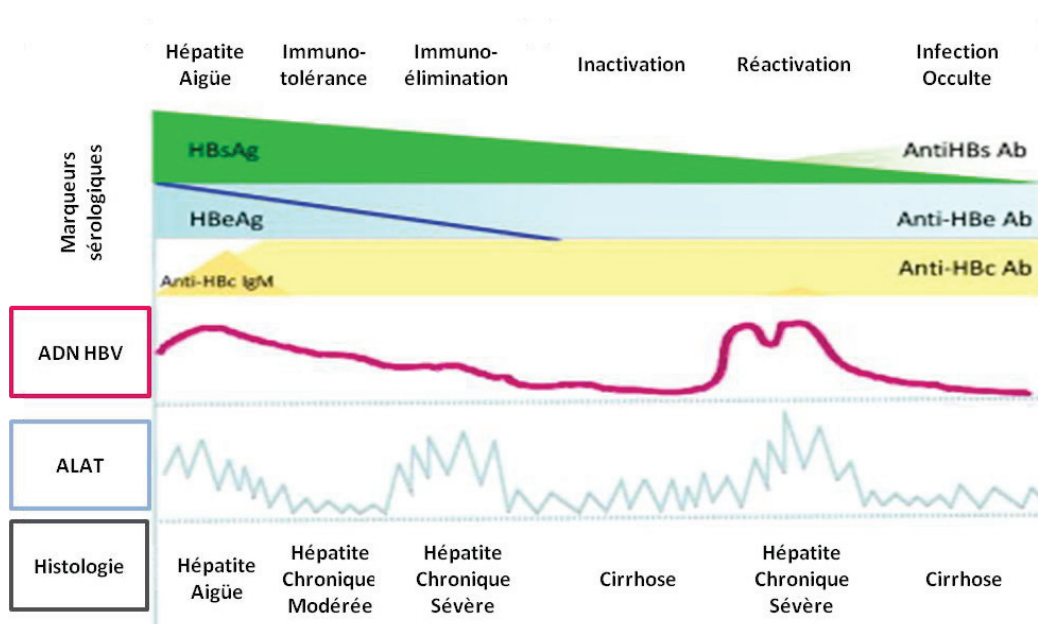


FIGURE 20 : L'HEPATITE B CHRONIQUE (DENY AND ZOULIM 2010)

Dans 70 à 90 % des cas, les porteurs chroniques ne développent pas de symptôme particulier. Pour les autres, l'atteinte hépatique est variable et peut aller d'une simple infiltration de l'espace porte par des cellules inflammatoires à divers stades de fibrose pour atteindre, *in fine*, la cirrhose et/ou le carcinome hépatocellulaire. Ces diverses lésions hépatiques sont le résultat d'un conflit constant entre réplication virale et contrôle de l'infection par le système immunitaire. Ainsi, quatre phases peuvent être observées classiquement dans l'évolution naturelle de l'infection chronique HBV : l'immunotolérance, la rupture de tolérance, l'inactivation et finalement la réactivation (ou guérison dans de rares cas) (Dandri and Locarnini 2012) (figure 20).

- **L'immunotolérance** : elle est caractérisée par une phase de tolérance immunitaire et une forte réplication virale associée à la présence des marqueurs viraux tels que l'AgHBe, l'AgHBs (~5 log IU/ml) et l'ADN viral (~20 000 IU/ml) (Nguyen, Desmond et al. 2009). Compte tenu de l'absence de réponse immune, cette phase n'est associée, ni à l'élévation des ALAT dans le sang, ni à la formation de lésion hépatiques (Hui, Leung et al. 2007). Le mécanisme d'immunotolérance est encore mal compris. Une forte charge virale, accompagnée d'un taux élevé d'antigènes viraux circulants, seraient nécessaires au maintien de la phase d'« immunotolérance ». Ainsi, l'absence de réponse immunitaire pourrait être la résultante directe de l'inhibition du système immunitaire par le virus HBV. En effet, de nombreuses stratégies d'évasion et de blocage de l'immunité innée et adaptative par les protéines HBV ont été reportées (cf. partie «La réponse immunitaire et son interaction avec le virus HBV»). Elles seraient dès lors intimement liées à l'établissement de l'infection chronique. Plus particulièrement, l'AgHBe pourrait avoir un effet tolérogène et/ou anergique sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'AgHBe/AgHBc (Milich and Liang 2003). D'autres composants viraux joueraient également un rôle important. Ainsi, la translocation de l'AgHBc du noyau au cytoplasme ainsi qu'une accumulation de mutations au niveau du promoteur PréCore/Core seraient nécessaires à la rupture de tolérance (Chu, Yeh et al. 1995; Yuen, Sablon et al. 2002). La compréhension de cette phase d'immunotolérance est donc cruciale pour l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques par réactivation du système immunitaire.
- **La rupture de tolérance** : cette phase est également appelée phase d'immuno-élimination. Elle est associée à une élévation des transaminases et à l'apparition de lésions hépatiques (nécrose et apoptose) étant à l'origine de l'émergence d'une cirrhose dans 15% des cas. En effet, cette phase est caractérisée par un réveil du système immunitaire qui entre en conflit avec la réplication virale fluctuante pour aboutir à la destruction des hépatocytes infectées (Chisari, Isogawa et al. 2010). La mise en place d'un traitement antiviral à ce stade peut améliorer le contrôle de la réplication HBV et ainsi permettre une rémission histologique plus rapide (Deny and Zoulim 2010). Cette phase peut se terminer par l'arrêt de la réplication accompagnée



d'une séroconversion HBe. Parfois, cette séroconversion peut être associée à une élévation, brutale mais transitoire, des transaminases, témoin de la nécrose hépatocytaire associée à la réponse immune cytotoxique.

- **L'inactivation** : le portage inactif est constaté lorsque le taux de transaminases dans le sang redevient normal et que la réplication virale est fortement diminuée ( $10^4$  copies/ml). Cette phase s'accompagne ainsi d'une disparition de l'activité nécro-inflammatoire hépatique et d'une séroconversion HBe. Cependant, malgré le contrôle de l'infection par le système immunitaire, les hépatocytes infectés peuvent continuer à répliquer le virus à bas bruit à cause de la persistance intrahépatique de l'ADNccc. Cette faible réplication limite la présentation des antigènes viraux à la surface des cellules infectées et donc l'inflammation induite par les lymphocytes T cytotoxiques (Tong and Trieu 2013).
- **Réactivation ou guérison** : Chez des patients au stade porteurs chroniques inactifs, une autre phase de la maladie peut se déclarer : la phase de réactivation. Elle est observée dans 20 à 30% des cas et correspond à une reprise de la réplication virale, de façon spontanée ou induite par une immunosuppression. On retrouve alors une augmentation de l'ADN viral et des transaminases, accompagnée de l'apparition d'une nécrose hépatique plus ou moins sévère (Perrillo 2001). Cette phase est la résultante de la persistance de l'ADNccc et s'accompagne généralement d'une sélection de souches virales plus infectieuses, souvent mutées au niveau du promoteur Core et PréCore (Yuen, Sablon et al. 2002). Dans de rares cas (1% des patients), une disparition de l'AgHBs sérique suivie de la séroconversion HBs, témoin de la guérison, est observée chez des patients en portage inactif (Fattovich, Bortolotti et al. 2008). Toutefois, cette séroconversion HBs ne met pas totalement les patients à l'abri de réactivations virales et de complications (Liaw and Chu 2009). En effet, la persistance de l'ADNccc dans le noyau des hépatocytes peut à tout moment induire une réactivation ainsi que des intégrations dans le génome cellulaire, favorisant dès lors le développement de CHC.

### ***II.1.3 Les complications hépatiques induites par HBV***

#### ***II.1.3.1 La cirrhose***

La progression de l'hépatite chronique, avec le développement d'une fibrose et/ou d'une cirrhose, favorise l'apparition d'un carcinome hépatique. La fibrogénèse est le résultat de l'inflammation chronique, de l'augmentation des ROS (pour « Reactive Oxygen Species ») et de l'infiltrat massif de cellules immunitaires activant les cellules étoilées ou « stellate cells » (Bataller and Brenner 2005). La cirrhose est le premier événement responsable des

complications hépatiques induites par HBV (Yang, Kim et al. 2011). Elle est en effet responsable de la mise en place d'hypertension portale, d'insuffisance hépatocellulaire et de l'avènement du CHC, causes de la morbidité et de la mortalité attribuées au virus HBV. Les facteurs de risque de survenue d'une cirrhose sont le stade de fibrose initiale, une activité histologique importante, la survenue d'épisodes de réactivation, une charge virale élevée, et le genre masculin (Fattovich, Bortolotti et al. 2008). Du fait de l'immunotolérance, elle est rarement observée chez l'enfant (Bortolotti, Guido et al. 2006).

### ***II.1.3.2 Le carcinome hépatocellulaire***

En 1988, des études épidémiologiques ont mis en évidence que le risque de développer un cancer du foie pour un patient chroniquement infecté par HBV était 100 fois plus élevé que pour un sujet sain (Beasley 1988). Les preuves d'un lien de causalité entre HBV et CHC ont été collectées pendant plus de 20 ans et ont conduit à classer HBV au premier rang des carcinogènes pour l'homme. En effet, l'incidence du CHC peut atteindre 60% des porteurs chroniques dans certaines régions endémiques, telles l'Asie et l'Afrique (Arzumanyan, Reis et al. 2013). De plus, le CHC, qui représente l'un des six cancers les plus répandus au monde, a un très mauvais pronostic de survie puisqu'il est classé au 3<sup>ème</sup> rang en termes de mortalité, derrière le cancer du poumon et celui de l'estomac (Fares and Peron 2013). En effet, en l'absence de traitement, le taux de survie est de 5% à 10%. Malgré les traitements par chirurgie et/ou transplantation hépatique pratiqués dans certains cas, le CHC provoque ainsi 500 000 à 600 000 décès par an de part le monde (Venook, Papandreou et al. 2010).

Le processus permettant la survenue du CHC *via* l'infection HBV est multifactoriel. Il est le résultat d'accumulation de modifications génétiques et épigénétiques induites par la régénération cellulaire massive, suite à la destruction des hépatocytes, l'inflammation chronique, et les facteurs viraux, tels que la protéine HBx (cf. partie « la protéine X ») et/ou la protéine PrS2/S, induisant des mécanismes de transactivation et/ou de mutagenèse insertionnelle (Fallot, Neuveut et al. 2012). L'inflammation et l'accumulation de protéines virales d'enveloppe au niveau du RE induisent également un stress oxydant, conduisant à l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et, *in fine*, à une instabilité chromosomique responsable de mutations et d'anomalies génétiques (El-Serag 2012). Des mutations dans la protéine PrS2 pourraient ainsi être associées à l'activation du stress oxydant (Hsieh, Su et al. 2004). En particulier, les ROS induisent l'activation de la voie MAPK et NFkB qui peuvent jouer un rôle important en carcinogénèse hépatique (Chemin and Zoulim 2009). Des modèles murins d'hépatocarcinogénèse ont permis la mise en évidence de l'implication de la cytokine IL-6 et de la voie NFkB dans le développement du CHC. Plus particulièrement, des microRNA (miR-124, miR-24 et miR-629) pourraient altérer les voies IL-6/Stat3 et Stat3/HNF4 promouvant ainsi l'inflammation et la carcinogénèse (Hatziapostolou, Polyarchou et al. 2011).



De plus, bien que le cycle viral ne nécessite pas l'intégration du génome HBV, des séquences virales défectives et réarrangées peuvent s'intégrer dans le génome cellulaire, et ceci dès la phase aigüe, exposant ainsi le patient au risque de développement du CHC. En effet, dans 80% des cas, l'ADN HBV est retrouvé intégré dans le foie néoplasique des patients porteurs chroniques (Brechot 2004). Il semblerait que le génome viral soit majoritairement retrouvé dans des régions transcriptionnellement actives, proches ou à l'intérieur des gènes cellulaires (Murakami, Saigo et al. 2005). Selon le site d'intégration des séquences virales, la tumorigénèse peut ainsi être le résultat de l'activation d'oncogènes cellulaires, de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, d'aberrations chromosomiques ou de la production de protéines défectives (Dejean, Bougueleret et al. 1986; Wang, Chenivresse et al. 1990; Paterlini-Brechot, Saigo et al. 2003). En outre, la possibilité d'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire peut expliquer l'apparition du CHC chez des patients n'ayant pas évolués jusqu'au stade cirrhotique (Pollicino, Vegetti et al. 2013). Par ailleurs, des mutations au sein des gènes TP53 et  $\beta$ -caténine, impliqués respectivement dans la réparation de l'ADN et dans l'adhésion cellulaire, sont fréquemment retrouvées dans les cancers du foie (Ozen, Yildiz et al. 2013).

D'autres facteurs étiologiques pouvant synergiser avec l'effet oncogène du virus HBV ont également été décrit. En effet, l'alcool, les maladies métaboliques (hématochromatose...), la coïnfection avec d'autres virus (HDV, HCV, HIV...) mais aussi l'exposition à des agents carcinogènes, tels que le chlorure de vinyle ou l'aflatoxine B1, pourraient augmenter le risque de développer un CHC (El-Serag 2012).

## II.2 Les traitements des hépatites B chroniques

Au-delà de la mise en place de campagne de prévention et de l'utilisation de vaccin pour limiter la propagation virale au sein de la population, la prise en charge des patients repose sur l'utilisation de traitements antiviraux pour limiter les lésions hépatiques générées par les hépatites B chroniques. L'objectif principal pour les cliniciens est de diminuer les risques d'évolution en cirrhose et/ou CHC en contrôlant le niveau de répllication virale. En effet, plusieurs études ont montré une corrélation entre le niveau de la charge virale, le degré des lésions hépatiques et le risque de développer des complications comme la cirrhose et/ou le CHC (Fattovich, Bortolotti et al. 2008). Finalement, l'objectif ultime reste la disparition de l'AgHBs sérique et la séroconversion qui lui est associée pour définir une réponse virologique complète avec *in fine* la guérison. En raison de l'apparition de résistances aux traitements, la résolution de l'infection reste malgré tout rarement atteinte (Zoulim and Locarnini 2013).

## II.2.1 Les immunothérapies

### II.2.1.1 Les immunoprophylaxies

La prophylaxie désigne un processus actif ou passif ayant pour but de prévenir l'apparition ou la propagation d'une maladie. Le terme peut faire aussi bien référence à des procédés médicamenteux qu'à des campagnes de prévention. Dans le cas du HBV, deux types d'immunoprophylaxies peuvent être distinguées : l'immunoprophylaxie active ou vaccination prophylactique, et l'immunoprophylaxie passive.

- **La vaccination prophylactique** : Actuellement, la vaccination est l'outil le plus efficace pour combattre l'épidémie HBV (Lavanchy 2012). Découvert en 1976, le premier vaccin a été obtenu en purifiant les particules subviraux présentes dans le sang des porteurs chroniques du HBV. Puis, dès 1986, des vaccins anti-HBV recombinants ont été commercialisés. Leur principe d'action repose sur l'induction d'anticorps anti-HBs neutralisants, prévenant ainsi l'infection des hépatocytes par les particules infectieuses circulantes. Ils sont très performants puisque leur efficacité pour prévenir l'apparition d'une hépatite B est d'environ 95% et la durée de protection est supérieure à 10 ans. De plus, la mise en place de campagne de vaccination, suivant les directives de l'OMS en 1991, a permis de faire diminuer la prévalence de l'AgHBs dans 150 pays. A Taïwan, la prévalence est passée de 9,8% en 1988 à 1,3% en 1994 d'après le suivi d'un groupe d'enfants de moins de 15 ans, ce qui fut un succès majeur (Chen, Chang et al. 1996). Par ailleurs, d'après une étude récente, la présence d'anticorps protecteurs ainsi que la persistance de la mémoire immunitaire ont été observées 20 ans après l'injection du vaccin chez des enfants thaïlandais (Poovorawan, Chongsrisawat et al. 2011).

Cependant, certains individus, telles les personnes âgées ou immunodéprimées, les patients sujets à des défaillances rénales récurrentes, les alcooliques et les porteurs des marqueurs HLA DR3 et HLA DR7, ne répondent que faiblement à cette immunisation. Ainsi, le procédé vaccinal a été amélioré avec, par exemple, l'utilisation de nouveaux adjuvants ou encore l'encapsulation des AgHBs dans des matrices de polyglycanes qui permettent de libérer en continu et de façon progressive l'immunogène. Un vaccin à base d'antigènes PréS2, PréS1 et S a également été mis au point et, après son test dans une cohorte de patients non répondeurs au vaccin classique, 70% d'entre eux montraient des titres d'anticorps protecteurs un an après la vaccination (Hollinger, Bell et al. 2007).

- **L'immunoprophylaxie passive** : Elle repose sur l'utilisation d'immunoglobulines anti-HBV (HBIG) provenant de sang de donneurs possédant de forts titres d'anticorps anti-HBV circulants. La durée de protection des HBIG n'excède pas deux mois et cette

prophylaxie n'est utilisée que dans des cas cliniques précis et dit à « hauts risques » comme :

- chez des nouveau-nés dont la mère est contaminée par HBV (en association avec la vaccination active anti-HBV). Toutefois, 4 à 10% des nouveau-nés seront malgré tout contaminés (Hou, Liu et al. 2005).

- chez des porteurs chroniques HBV ayant subi une transplantation hépatique pour prévenir la réinfection du greffon. Celle-ci peut être, en effet, limitée dans 65 à 80% des cas (Starkel, Stoffel et al. 2005).

- chez des individus non-vaccinés ayant été exposés de façon accidentelle au virus HBV (blessure avec un objet contaminé, rapport sexuel non protégé avec une personne à risque...).

### ***II.2.1.2 Les traitements à base d'interféron***

Les interférons de type I étaient à l'origine des premières thérapies utilisées contre les hépatites B chroniques (Greenberg, Pollard et al. 1976). Il existe des différences d'activité selon les sous types utilisés puisque, par exemple, l'IFN- $\beta$  et l'IFN- $\alpha 8$  montrent une activité antivirale six fois plus efficace que celle de l'IFN- $\alpha 1$  *in vitro* (Schulte-Frohlinde, Seidler et al. 2002). Il a également été montré que les IFN de type III étaient des inhibiteurs puissants de la réplication virale, et qu'ils pouvaient partager un mécanisme d'action similaire avec les IFN de type I (Pagliaccetti, Chu et al. 2010; Nakagawa, Hirata et al. 2013).

A ce jour, seuls les IFN- $\alpha 2b$  et - $\alpha 2a$  pégylés sont approuvés pour leur utilisation en clinique. Ainsi, après un traitement à base d'IFN, la séroconversion de l'AgHBe est observée chez environ 30% des patients, ainsi que la clairance de l'AgHBs dans environ 10% des cas plusieurs mois après l'arrêt du traitement (Janssen, van Zonneveld et al. 2005). Un taux élevé de transaminases, un nombre de copies d'ADNccc bas, une faible quantité d'AgHBs et d'AgHBe circulants ainsi que le génotype A sont des facteurs corrélés avec un bon pronostic de réponse aux traitements par les interférons (Chan, Wong et al. 2007; Buster, Flink et al. 2008).

D'une façon générale, le mode d'action des IFN est caractérisé d'une part par l'activation du système immunitaire inné, mais également par un effet antiviral direct sur la réplication virale, accompagné de la normalisation des transaminases hépatiques (ALAT) et de la séroconversion de l'AgHBe (Perrillo 2009).

Ainsi, l'activation de la voie IFN directement par l'IFN- $\alpha$  lui-même ou indirectement par un ligand des PRRs (pour « Pathogen Recognition Receptor ») permettrait d'inhiber la réplication virale (Isogawa, Robek et al. 2005; Zhang, Kraft et al. 2012). L'activation de la réponse innée conduit *in fine* à la synthèse d'effecteurs cellulaires impliqués dans la mise en place d'un état antiviral. Suite à une étude menée sur des souris transgéniques HBV

infectées par le virus LMCV, connu pour induire une forte réponse interféron anti-HBV, un certain nombre d'effecteurs antiviraux impliqués dans la dégradation des protéines et dans la transduction du signal ont été mis en évidence, et ceci *via* l'utilisation de puces à ADN (Wieland, Vega et al. 2003). Il semblerait que le protéasome ainsi que les protéines PKR, IRF1 et MxA soient impliqués dans l'inhibition de la réplication HBV, comme également décrit dans d'autres études (Guidotti, Morris et al. 2002; Peltekian, Gordien et al. 2005). L'activation de la voie IFN pourrait en effet déstabiliser les nucléocapsides et induire leur dégradation *via* le protéasome (Xu, Guo et al. 2010). Des équipes ont, en particulier, pu souligner l'action antivirale des voies de transduction NFkB et de Myd88, protéines impliquées dans la transduction du signal suivant l'activation des PRRs. En effet, l'activation de MyD88 induirait la dégradation de l'ARNpg et la rétention des ARNm d'enveloppe dans le noyau (Li, Lin et al. 2010). L'assemblage des capsides pourrait également être altéré (Wieland, Eustaquio et al. 2005). Par ailleurs, la transcription des ARN viraux serait une cible antivirale de l'IFN, et ceci *via* l'induction de modifications épigénétiques au niveau de l'ADNccc (Uprichard, Wieland et al. 2003; Belloni, Allweiss et al. 2012). La famille des protéines APOBEC, induites par l'IFN- $\alpha$ , pourrait également être impliquée dans la restriction HBV (Bonvin and Greeve 2008). Les protéines APOBEC agiraient *via* différents mécanismes impliquant également l'inhibition de l'encapsidation de l'ARNpg, la production de capsides immatures, ainsi que des hypermutations G/A au niveau du génome viral *via* leur activité enzymatique intrinsèque (Baumert, Rosler et al. 2007). Les protéines APOBEC, en interagissant avec la polymérase virale, seraient incorporées dans la nucléocapside et moduleraient ainsi l'infectiosité des virions néoformés (Nguyen and Hu 2008). Cependant, le rôle des protéines APOBEC est encore à l'heure actuelle discuté puisque certains travaux suggèrent que l'effet antiviral médié par l'interféron reste indépendant de cette famille de protéines (Turelli, Liagre-Quazzola et al. 2008).

Finalement, chez les patients porteurs chroniques, l'IFN- $\alpha$  pégylé pourrait induire des effets divergents entre les réponses innées et adaptatives. Il activerait en effet les NK, en augmentant leur capacité à sécréter de l'IL-15 et de l'IFN- $\gamma$ , mais parallèlement, il engendrerait une déplétion des lymphocytes T CD8+ au sein des PBMC, ce qui limiterait son action (Micco, Peppia et al. 2013). En plus de ses nombreux effets secondaires, la thérapie à base d'IFN n'est efficace que chez 30% des patients (Janssen, van Zonneveld et al. 2005). Le virus HBV aurait ainsi mis en place des stratégies d'évasion efficaces *via* l'action immunomodulatrice de ces protéines pour contrer son efficacité (cf. partie « HBV : un virus particulièrement efficace pour inhiber les réponses immunes de l'hôte »).

## II.2.2 Les antiviraux

Pour pallier au faible nombre de patients répondeurs aux thérapies à base d'IFN et aux effets secondaires induits par ces traitements, de nouvelles molécules antivirales sont couramment utilisées en clinique, et ceci grâce aux avancées de la recherche sur les étapes de réplication du HBV : les analogues de nucléos(t)ides (Zoulim and Locarnini 2012).

### II.2.2.1 Les analogues de nucléos(t)ides

De part l'étape de transcription inverse incluse dans le cycle de réplication du HBV, l'utilisation des analogues de nucléos(t)ides en clinique pour le traitement des hépatites B chroniques a fortement été inspirée de la recherche effectuée sur le virus de l'immunodéficience humaine (HIV). En effet, par un mécanisme de compétition entre les nucléos(t)ides et leurs analogues ciblant l'activité de la polymérase virale, l'initiation de la rétrotranscription ainsi que l'élongation des brins d'ADN viraux sont inhibées (figure 21). Par incorporation dans la chaîne d'ADN néo-synthétisée, les analogues de nucléos(t)ides peuvent ainsi inhiber la polymérisation du brin (-) en jouant le rôle de terminateur de chaîne. En effet, ces molécules sont dépourvues d'un groupement hydroxyle en 3' ce qui empêche l'ajout d'un autre nucléotide en aval, bloquant ainsi l'élongation de la chaîne. Ce mécanisme peut également être observé lors de l'élongation du brin (+) (De Clercq 1999). Seule la famille des analogues de purine peut inhiber l'initiation de la transcription inverse en remplaçant le premier dGTP se liant de façon covalente à la polymérase virale pour amorcer la synthèse du brin (-) (Seifer, Hamatake et al. 1998).

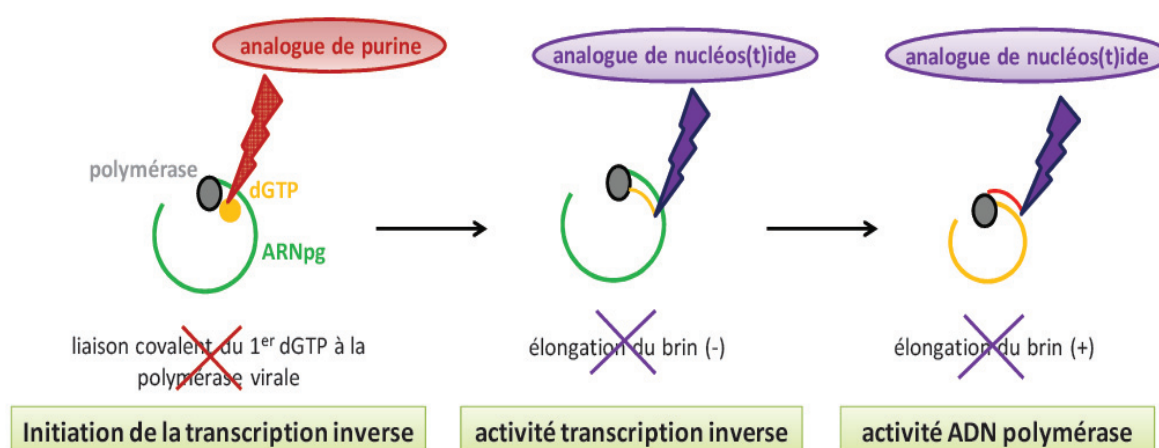


FIGURE 21 : MODE D'ACTION DES ANALOGUES DE NUCLEOS(T)IDES : ETAPES DU CYCLE VIRAL CIBLEES ET CONSEQUENCES SUR LA REPLICATION DU VIRUS HBV

D'un point de vue pharmacologique, l'efficacité de ces antiviraux dépend de leur capacité à pénétrer à l'intérieur des cellules et à être triphosphorylée par des kinases cellulaires (De Clercq 1999), mais également de leur demi-vie sous forme phosphorylée active, du degré de compétition avec les nucléos(t)ides endogènes, de leur force de liaison à la polymérase virale (au niveau de la région YMDD), ainsi que de leur index de sélectivité (rapport entre la dose cytotoxique et la dose antivirale) .

Le premier analogue de nucléoside approuvé par la FDA (pour « Food and Drug Administration ») pour le traitement des hépatites B chroniques en clinique fut la Lamivudine en 1998, puis vint l'Adéfovir Dipivoxil en 2002, l'Entécavir en 2005, la Telbivudine en 2006 et plus récemment le Ténofovir en 2008. De façon générale, de tels traitements permettent de diminuer la réplication virale jusqu'à rendre le taux sérique d'ADN HBV indétectable chez les patients, mais également d'améliorer les signes histologiques hépatiques, même chez des patients non répondeurs aux traitements IFN.

Cependant, même si ces antiviraux permettent d'inhiber de façon efficace la réplication virale, ils ne permettent pas une élimination totale du virus, et plus particulièrement de l'ADNccc au niveau nucléaire dans les hépatocytes infectés. En effet, après l'arrêt du traitement, un rebond de la charge virale, avec une exacerbation de la maladie hépatique, est observé. Ceci implique dès lors une administration prolongée de ces médicaments. Cette prise à long terme est également accompagnée de l'émergence de souches HBV mutantes chez les patients, et ceci *via* un mécanisme de pression de sélection exercé par les antiviraux eux-mêmes. Ces souches mutantes, devenues ainsi résistantes aux analogues de nucléos(t)ides, sont à l'heure actuelle responsables des échecs thérapeutiques en clinique (Zoulim and Locarnini 2012).

### ***II.2.2.2 La résistance aux traitements***

Comme explicité précédemment, le problème majeur lié à l'utilisation prolongée des analogues de nucléos(t)ides est l'émergence de mutants résistants aux traitements, conséquence de la variabilité génétique spontanée du virus. En effet, le virus HBV circule dans l'organisme sous forme de quasi-espèce virale. Etant dépourvue d'activité exonucléase 3'-5', la polymérase virale ne peut réparer ses propres erreurs, commises lors de l'incorporation de nouveaux nucléotides dans la chaîne d'ADN en cours d'élongation. Cependant, beaucoup de mutations ne sont pas tolérées par le virus du fait de l'extrême compaction du génome, et seules les souches mutantes viables et capables de se répliquer peuvent alors circuler librement. Ainsi, après sélection des souches mutantes par le traitement antiviral, seuls les virions néo-synthétisés matures, et donc résistants, peuvent être sécrétés et ainsi aller réinfecter d'autres cellules. Les hépatocytes nouvellement infectés archivent donc les résistances au niveau leur noyau *via* la synthèse de l'ADNccc à partir d'une matrice d'ADN RC mutée. La rapidité de sélection du mutant est fonction de sa vitesse

de réplication, de ses performances d'infection, de synthèse protéique et de sécrétion. Toutes ces caractéristiques sont regroupées sous le terme de « fitness viral » (Durantel 2010; Zoulim 2011).

Les premiers mutants résistants sont apparus chez les patients traités par la Lamivudine, premier analogue de nucléos(t)ides utilisé en clinique. Après 5 ans de traitement, 80% des patients sous Lamivudine développent ainsi une résistance contre 30% des patients traités par l'Adéfovir. En ce qui concerne la Telbivudine, l'incidence de la résistance est de 25% chez les patients AgHBe positifs et de 11% chez les patients AgHBe négatifs après 2 ans de traitement seulement. A l'inverse, l'Entécavir et le Ténofovir semblent être des molécules antivirales prometteuses puisque seulement 1,2% des patients développent une résistance après 6 ans de traitement à l'Entécavir, et la résistance au Ténofovir reste nulle après 3 ans de traitement (Zoulim 2011). Néanmoins, l'apparition de mutants à long terme, *via* la pression de sélection exercée par ces drogues, ne peut pas être exclue.

Des résistances croisées ont également été décrites chez des patients. En effet, puisque certains analogues de nucléos(t)ides interagissent de façon similaire avec la polymérase virale, certaines mutations peuvent conférer une résistance à plusieurs molécules antivirales. Il a ainsi été montré que les mutations qui confèrent une résistance à la Lamivudine (rtL180M, rtM204V/I/S, rtV173L) induisent également une résistance aux traitements à base d'Emtricitabine ou de Telbivudine. A l'inverse, ces souches restent sensibles à l'Adéfovir et au Ténofovir. Le phénomène de résistance croisée conditionne le choix de la stratégie thérapeutique à adopter par le clinicien. Les options thérapeutiques seront diminuées dès lors qu'une souche présentant des résistances croisées est à l'origine d'un échappement virologique, puis clinique, chez un patient. La connaissance des différentes mutations dans la polymérase et de leur phénotype de résistance *in vitro* est donc primordiale pour le clinicien afin d'adapter le traitement en fonction du profil de résistance du patient (Zoulim and Locarnini 2012).

### ***II.2.3 Les nouvelles stratégies antivirales***

Du fait des résistances virales face aux traitements (IFN, analogue de nucléos(t)ides) et de la persistance de l'ADNccc dans les hépatocytes, il apparaît comme urgent de développer de nouvelles molécules et/ou stratégies antivirales pour compléter l'arsenal thérapeutique des praticiens.

Ainsi, l'inhibition de l'étape d'entrée, de l'assemblage des capsides et de la morphogénèse virale ainsi que l'éradication de l'ADNccc peuvent être des stratégies permettant d'inhiber la réplication virale et de s'affranchir des résistances. De plus, de récentes découvertes sur le contrôle de l'infection HBV par le système immunitaire inné et



adaptatif permettent d'imaginer de nouvelles stratégies immunomodulatrices suscitant l'exacerbation des réponses immunitaires afin d'éradiquer l'infection.

### ***II.2.3.1 La vaccination génétique en thérapie***

La vaccination thérapeutique pourrait être une autre alternative pour les patients non répondeurs au vaccin classique. Elle est basée sur l'injection intra-épidermique ou intramusculaire d'un ADN nu codant un gène viral qui sera exprimé par la cellule ayant captée le transgène (Saade, Buronfosse et al. 2008). Ainsi, l'antigène pourra être exprimé sur le long terme et, de part sa synthèse intracellulaire, présenté directement par les CMH de classe I afin d'activer les lymphocytes T cytotoxiques.

L'efficacité thérapeutique d'un vaccin à ADN codant les protéines d'enveloppe du virus HBV a été démontré pour la première fois dans un modèle murin exprimant constitutivement l'AgHBs (Mancini, Hadchouel et al. 1996). La clairance virale observée était non lytique et dépendante de la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T activés. En 2004, une première étude clinique de phase I, utilisant un vecteur codant les protéines S et M, a été menée sur des patients porteurs chroniques non répondeurs aux traitements antiviraux classiques (Mancini-Bourgine, Fontaine et al. 2004). Une baisse transitoire de la virémie chez 60% des patients ainsi qu'une séroconversion AgHBe/AcHBe chez 20% d'entre eux ont pu être observées. Cette réponse pourrait être le résultat de l'activation des lymphocytes T CD8+ mais aussi des cellules NKs. Plus tard, une seconde étude clinique utilisant des vecteurs codant la majorité des antigènes viraux (AgHBs, AgHBe, AgHBc et Pol), ainsi que l'IL-12, a été réalisée sur 12 porteurs chroniques du HBV sous traitement lamivudine. Une baisse de la virémie associée à une réponse T CD4+, spécifique et productrice d'IFN- $\gamma$ , a pu être maintenue pendant un an après le traitement. L'infection a même été résolue chez deux patients (Im, Yang et al. 2009). Plus récemment, une étude utilisant une thérapie combinée associant des analogues de nucléosides et la vaccination génétique, réalisée en France, n'a pas pu confirmer l'efficacité de la vaccination thérapeutique. En effet, après arrêt du traitement antiviral, un rebond de l'infection a pu être observé chez 97% des patients.

Même si cette stratégie reste prometteuse en permettant l'activation d'une réponse T spécifique des antigènes HBV, l'efficacité chez l'homme demeure faible. D'autres stratégies d'administration du vecteur ADN permettant d'améliorer l'immunogénicité du vaccin restent encore à évaluer.

### ***II.2.3.2 Une nouvelle classe d'antiviraux...***

A l'heure actuelle, quelques molécules ciblant les étapes de réplication sont en cours de développement. Parmi celles-ci, il existe des antiviraux non nucléos(t)idiques ciblant



l'assemblage des capsides : les hétéroaryldihydropyrimidines (HAP) et les phénylpropénamides (AT).

- Les **molécules HAP** sont capables d'inhiber la réplication virale par interaction directe avec la protéine Core (Weber, Schlemmer et al. 2002; Deres, Schroder et al. 2003). Les principaux représentants de cette famille sont les composés BAYER-41 4109 et HAP-1. A faible dose, ces molécules accélèrent l'assemblage des protéines Core induisant la formation de capsides anormales. A partir d'un certain seuil (1 HAP pour 5 capsides), ces molécules induisent une malformation de la structure quaternaire de la protéine Core, accélérant ainsi sa dégradation par le protéasome (Bourne, Lee et al. 2008). Le composé BAY-41 4109 a prouvé plusieurs fois son efficacité chez la souris et peut représenter un espoir dans l'établissement de vraies thérapies combinatoires (Brezillon, Brunelle et al. 2011). En effet, aucune résistance croisée n'a été démontrée entre les molécules anticapsides et les souches HBV résistantes aux traitements Lamivudine et Adéfovir (Billioud, Pichoud et al. 2011).
- Les **phénylpropénamides**, représentés par les composés AT-61 et AT-130, peuvent également inhiber la morphogénèse des capsides en ciblant spécifiquement l'étape d'encapsidation de l'ARNpg (Katen, Chirapu et al. 2010). Pour se faire, ils initient l'assemblage de la capside sans la présence du complexe d'initiation ARNpg/polymérase ce qui promeut la morphogénèse de capsides immatures. Ceci aura pour conséquence la diminution du taux d'ADNccc dans les hépatocytes traités. En plus d'une action synergique observée avec la Lamivudine, ces molécules ne présentent pas non plus de résistance croisée *in vitro* avec les souches résistantes circulantes et représentent ainsi des thérapies prometteuses (Billioud, Pichoud et al. 2011).

### **II.2.3.3 Les agonistes de PRRs**

Les PRRs (pour « Pathogen Recognition Receptor ») sont des récepteurs membranaires (TLRs) ou cytoplasmiques (RLRs) capables de détecter des motifs microbiens redondants ou PAMPs (pour « Pathogen Associated Molecular Pattern »), et d'activer une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la mise en place d'un programme de défense antimicrobien dans les cellules spécialisées (NKs, DCs..) ou non (Hépatocytes). La stimulation de la réponse innée, par activation d'un PRR donné, pourrait ainsi permettre d'endiguer l'infection HBV en induisant un état antiviral au sein de l'hépatocyte infecté et/ou en activant les cellules immunitaires innées résidentes du foie (cf. partie « Réponse immunitaire innée »).

Ainsi, il semblerait que l'**activation des TLRs** puissent contrôler l'infection HBV, comme démontré dans un modèle murin transgénique *in vivo* (Uprichard, Wieland et al.

2003; Isogawa, Robek et al. 2005; Wu, Lu et al. 2007). Dans des hépatocytes primaires de marmotte infectés par le WHV, il est également établie que la stimulation de TLR4 par un ligand de type LPS permettait d'inhiber la réplication virale *via* l'activation de l'immunité innée, mais de façon indépendante à la voie IFN de type I (Zhang, Meng et al. 2009). De la même façon, la stimulation de TLR2 par un ligand de type Pam2CSK4 diminuerait le taux d'ADN viral et la formation des nucléocapsides dans des cellules d'hépatome, *via* l'activation de la voie NFkB dépendante de Myd88. Cette activation induirait en effet la sécrétion des cytokines proinflammatoires IL-8 et TNF- $\alpha$  capables de contenir l'infection dans les cellules HepG2 et HuH7 transfectées/transduites avec un vecteur codant le génome HBV (Thompson, Colledge et al. 2009). A l'inverse, des données ont montré que les agonistes des TLR3, 4, 5, 7 et 9 injectés en intraveineuse dans un modèle murin transgénique induisaient un effet antiviral dépendant de l'activation de la voie IFN de type I (Isogawa, Robek et al. 2005). La stimulation par les cytokines IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  permettrait en effet d'inhiber la réplication virale en dégradant l'ARN viral et en déstabilisant les capsides comme démontré dans un modèle murin transgénique HBV (McClary, Koch et al. 2000). Plus particulièrement, il semblerait que l'effet antiviral observé après stimulation par les ligands prototypiques de TLR3 et TLR4 puisse principalement être médié par l'activation des NKs et des KCs, alors que l'effet antiviral observé lors des stimulations de type TLR5, TLR7 et TLR9 serait plutôt la conséquence de l'activation des DCs *in vivo* (Wu, Lu et al. 2007). L'effet antiviral de TLR7 a également été observé chez la marmotte et le chimpanzé respectivement infectés par les virus WHV et HBV. En effet, la diminution de la charge virale et du taux d'AgHBs (ou WHsAg pour la marmotte) ont pu être corrélés avec la détection d'IFN- $\alpha$  dans les *sera* et l'induction des ISGs (pour « Interferon Stimulated Gene ») dans les PBMC et les hépatocytes (Lanford, Guerra et al. 2013).

Par ailleurs, l'activation de l'immunité innée, par la surexpression d'adaptateurs cellulaires impliqués dans la cascade de signalisation en aval des TLRs, pourrait également inhiber la réplication du virus HBV. En effet, la surexpression des adaptateurs TRIF, IPS-1 et Myd88 permettrait d'abolir la transcription des gènes viraux en cellules d'hépatome (Guo, Jiang et al. 2009).

**L'activation des senseurs RLRs** pourrait également induire un état antiviral dans la cellule infectée. En effet, l'impact de l'activation de RIG-I sur la réplication virale a également été observé *in vivo* dans un modèle murin (Ebert, Poeck et al. 2011).

Finalement, en plus de leur effet antiviral direct sur la réplication et de leur capacité à activer les NPC (pour « Non Parenchymal Cells ») pour endiguer l'infection, les agonistes de TLRs pourraient également jouer un rôle dans la formulation de nouveaux vaccins thérapeutiques en tant qu'adjuvants. Ils seraient en effet moins toxiques et plus immunogènes que les adjuvants utilisés classiquement en vaccination (Romagne 2007). L'utilisation d'un ligand spécifique de TLR4 a d'ailleurs été approuvée dans la formulation de

deux vaccins anti-HBV : Fendrix et Supervax. Des ligands synthétiques de type ODN, contenant des motifs CpG activant la signalisation TLR9, pourraient également être utilisés pour exacerber la réponse immunitaire (Gupta and Cooper 2008). Actuellement, et ceci en combinaison avec de l'AgHBs recombinant, l'ODN CpG de type B appelé 1018 ISS est en essais clinique de phase III. Les premiers résultats semblent montrer une efficacité vaccinale proche de 100% pour le groupe ayant reçu l'injection du vaccin AgHBs-1018 ISS contre 64% pour l'injection conventionnelle d'AgHBs recombinant (Sablan, Kim et al. 2012).

Ces résultats mettent ainsi en évidence le potentiel thérapeutique prometteur des agonistes de PRRs dans le contrôle de l'infection HBV *in vitro* et *in vivo*, et soulignent l'intérêt de développer de nouvelles approches antivirales basées sur la stimulation de l'immunité innée. Une meilleure compréhension du mécanisme d'action des voies PRRs et de l'interaction du système immunitaire innée avec le virus HBV reste cependant nécessaire avant de pouvoir imaginer de réelles stratégies immuno-thérapeutiques en clinique.

### III-LA REPONSE IMMUNITAIRE DE L'HOTE ET SON INTERACTION AVEC LE VIRUS HBV

Le système immunitaire d'un organisme est un système biologique constitué d'un ensemble coordonné d'éléments de reconnaissance et de défense qui discrimine le « soi » du « non-soi ». L'immunité d'un organisme permet en effet de se protéger du “non-soi” caractérisé par les organismes pathogènes (virus, bactéries, parasites...), les cellules cancéreuses et certaines particules ou molécules « étrangères » (certains poisons, toxiques...), en les détruisant. La réponse immunitaire résulte ainsi de l'activation de ce système de défense pour se protéger de l'agression ou du dysfonctionnement de l'organisme. Il existe deux types de mécanismes de défense agissant en synergie, et dépendant l'un de l'autre : l'immunité non spécifique ou innée et l'immunité spécifique ou adaptative (figure 22).

Le système immunitaire inné est l'un des premiers axes de défense d'un organisme face à une agression. Il met tout d'abord en jeu des barrières physiques telles la peau, les muqueuses, les cils vibratils, mais aussi des barrières chimiques tels les peptides antimicrobiens et les enzymes protéolytiques sécrétées. Le système inné fait également appel à des cellules capables de reconnaître de façon non spécifique un pathogène donné grâce à des senseurs appelés PRRs (pour « Pathogen Recognition Receptor ») qui reconnaissent des motifs microbiens conservés lors de l'évolution appelés PAMPs (pour « Pathogen Associated Molecular Pattern ») (Kumar, Kawai et al. 2011). Ces cellules peuvent être des cellules immunitaires comme les macrophages, les DCs, les NKs/NKTs (pour « Natural Killer ») mais également des cellules non spécialisées comme les hépatocytes. En effet, toutes les cellules de l'organisme sont capables de répondre à une infection virale pour inhiber la réplication du virus, protéger les cellules voisines du pathogène et, de ce fait, empêcher sa propagation. L'activation de ce système inné induit l'activation du système adaptatif, *via* les cellules présentatrices de l'antigène (CPA).

L'immunité adaptative permet quant à elle d'amplifier la réponse immunitaire et confère également une réponse spécifique aux antigènes étrangers. Elle est par conséquent particulièrement adaptée à l'agent infectieux. De plus, une réponse mémoire permettant une élimination ultérieure plus efficace du même agent infectieux se met en place. Les cellules de l'immunité adaptative constituent ainsi un complément essentiel de la réponse immunitaire innée et sont caractérisées par les lymphocytes T et B.

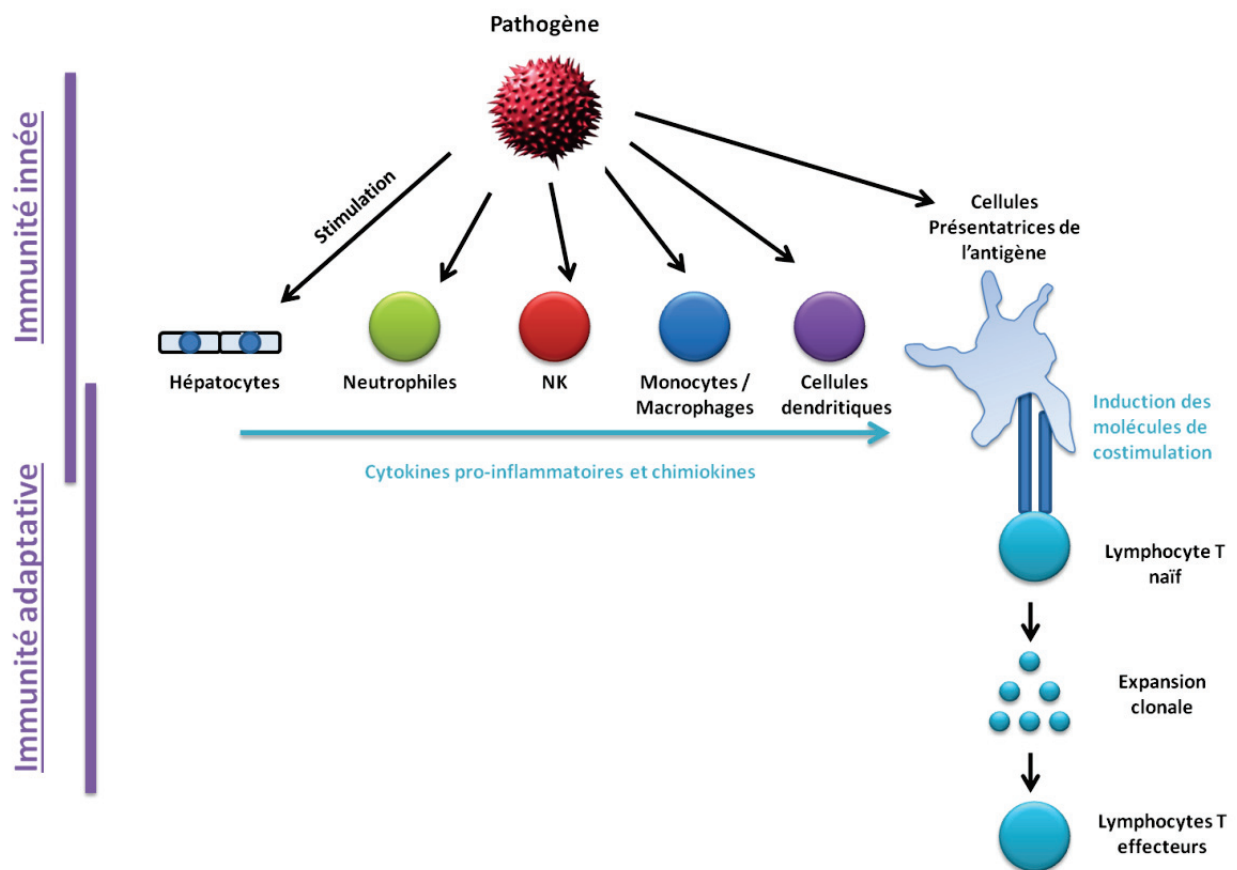


FIGURE 22 : ACTIVATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE INNE ET ADAPTATIF SUITE A LA DETECTION D'UN PATHOGENE

### III.1 Le foie : un organe immunocompétent

En plus de ces fonctions multiples assurant l'homéostasie de l'organisme (détoxification, métabolisme du glucose, métabolisme lipidique..), le foie possède des fonctions immunitaires. Plus particulièrement, il est impliqué dans l'immunotolérance face aux antigènes du non-soi provenant soit du tractus digestif *via* la veine porte, soit de la circulation sanguine *via* l'artère hépatique dans un contexte non inflammatoire (Thomson and Knolle 2010). Cependant, le foie peut également participer à la défense de l'organisme lorsque des signaux de danger sont perçus par les cellules résidentes du foie. En effet, en plus des hépatocytes et des cellules non parenchymales (cellules endothéliales, cellules étoilées..), le foie est composé de cellules immunitaires résidentes tels les cellules NKs, les NKTs, les DCs et les macrophages (également nommés cellules de Kupffer), capables d'induire une réponse antivirale (figure 23) (Dong, Wei et al. 2007; Liaskou, Wilson et al. 2012; Protzer, Maini et al. 2012).

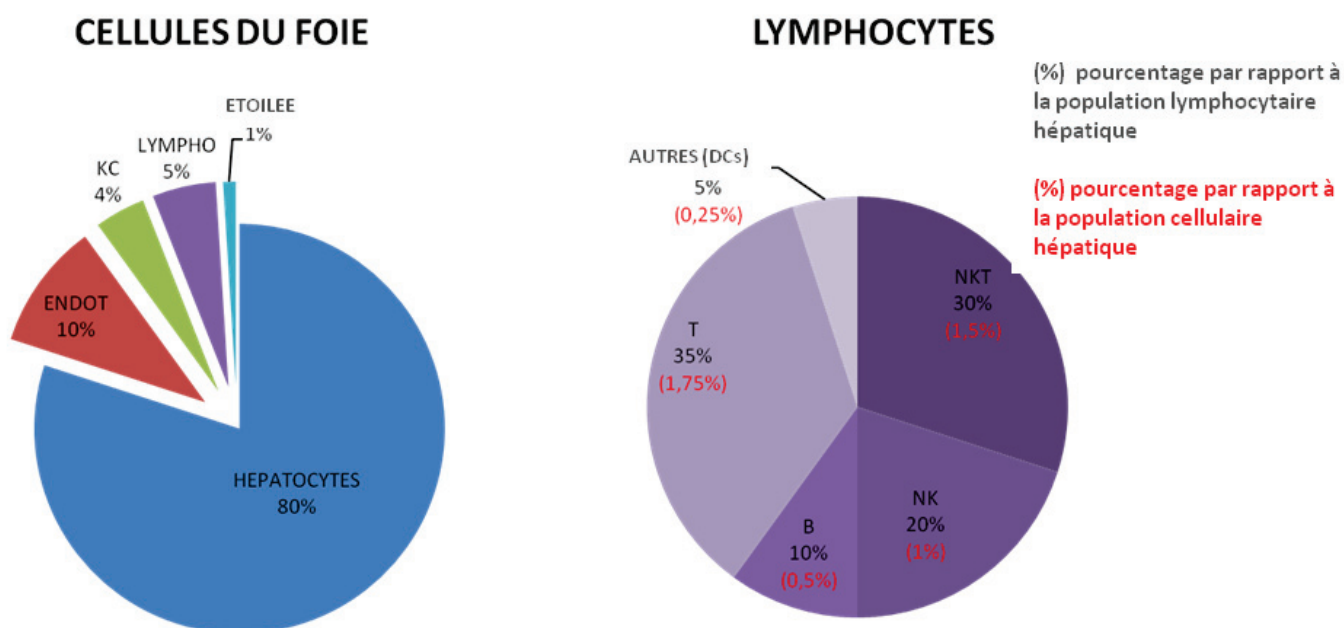


FIGURE 23 : REPARTITION DES DIFFERENTES POPULATIONS CELLULAIRES ET DES LYMPHOCYTES DANS LE FOIE HUMAIN (ADAPTEE DE DONG ET AL. 2007)

### III.1.1 Les hépatocytes

Le foie est composé majoritairement d'hépatocytes (80%) qui assurent l'homéostasie de l'organisme par différentes activités métaboliques, telles la détoxification des médicaments, l'élimination de l'urée, la synthèse du cholestérol et la mise en réserve du glucose sous forme de glycogène. Par ailleurs, ces cellules immunocompétentes expriment à leur surface des senseurs microbiens (PRRs) capables d'induire une réponse antivirale à l'encontre d'un pathogène donné (Kumar, Kawai et al. 2011). Elles peuvent ainsi participer à l'activation du système immunitaire et répondre à une infection microbienne (cf. partie "l'immunité innée").

### III.1.2 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales du foie (LSECs) forment la paroi des sinusoides et forment des fenestrations (diamètre 100-150nm), permettant la diffusion de molécules et complexes macromoléculaires.

Ce sont des acteurs clefs de l'angiogenèse et de la vasculogenèse du foie, jouant ainsi un rôle majeur au cours de la régénération hépatique, et par extension au cours de la tumorigenèse. Par ailleurs, elles jouent également un rôle important dans la clairance hépatique grâce à leur forte activité d'endocytose, dépendante des récepteurs

« scavengers », capable d'éliminer de nombreuses macromolécules présentes dans le sang. Elles expriment à leur surface de nombreuses molécules d'adhésion et sécrètent des chimiokines impliquées dans l'activation du système immunitaire. Elles seraient ainsi capables de présenter des antigènes circulants aux lymphocytes T CD4+ et T CD8+ ce qui leur confèreraient un rôle majeur dans la surveillance immunitaire au niveau hépatique (Knolle and Limmer 2003).

### **III.1.3 Les cellules étoilées**

Les cellules étoilées hépatiques sont également localisées au niveau des sinusoides du foie. Plus particulièrement, elles sont localisées dans l'espace de Disse, entre les LSECs et les hépatocytes, avec lesquels elles sont en contact étroit par l'intermédiaire d'extensions cytoplasmiques.

Ce sont des fibroblastes spécialisés dans le stockage et le métabolisme de lipides tels que la vitamine A (rétinol) et les triglycérides. Les cellules étoilées hépatiques sont également responsables de la synthèse de matrice extracellulaire présente au niveau de l'espace de Disse, favorisant la cohésion, la communication et la différenciation des divers types cellulaires. L'activation de ces cellules étoilées par une réponse inflammatoire entraîne une augmentation de la sécrétion de cette matrice, facteur majeur du développement pathologique d'une fibrose hépatique. Des études récentes ont également suggéré que ces cellules étoilées pourraient avoir un rôle de cellules présentatrices de l'antigène (Crispe 2009).

### **III.1.4 Les cellules de Kupffer**

Les cellules de Kupffer (KCs) sont les macrophages résidents du foie et représentent 80% du pool de macrophages au sein de l'organisme, faisant du foie un organe clé dans la défense de l'organisme contre les pathogènes (Seki, Habu et al. 2000). Elles sont ancrées au niveau de la lumière des sinusoides, et par des extensions cytoplasmiques qui peuvent traverser les fenestrations des cellules endothéliales, les KCs peuvent interagir avec les hépatocytes. Ces cellules sont ainsi en contact permanent avec le sang.

Ce sont des phagocytes spécialisés dans la capture et la dégradation des particules de taille importante ( $> 1\mu\text{m}$ ) qui circulent dans le sang. Elles peuvent phagocyter des débris cellulaires, et ainsi participer à l'homéostasie tissulaire, *via* les récepteurs « scavengers », phosphatidylserines, thrombospondines, intégrines et le complément (Liaskou, Wilson et al. 2012). La phagocytose s'accompagne d'un changement dans leur profil d'expression des récepteurs, et est accompagnée de la sécrétion de cytokines proinflammatoires. Les macrophages peuvent également détecter des signaux de danger *via* les TLRs, les PRRs intracellulaires et IL-1R. Finalement, elles participent au recrutement des cellules de



l'immunité innée et modulent leur activité en sécrétant des médiateurs inflammatoires tels que TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-10. Enfin, il a été suggéré que les cellules de Kupffer pourraient également jouer le rôle de cellules présentatrices de l'antigène permettant de réguler l'activité des lymphocytes T (Crispe 2009).

### III.1.5 Les NKs et les NKTs

Les NKs et NKTs, représentant 50% des lymphocytes intrahépatiques, sont capables de sécréter une quantité importante de cytokines pro- et anti-inflammatoires pour réguler l'immunité innée hépatocytaire et contrôler l'infection virale.

Les **NKs** (pour « Natural Killers ») sont produits à partir des cellules souches hématopoïétiques. Elles subissent ensuite un processus de maturation leur permettant d'acquérir, *in fine*, leur fonction effectrice avant d'être mises en circulation dans le sang et d'atteindre ainsi les poumons, la rate et le foie (Gregoire, Chasson et al. 2007). Les NKs sont ainsi une population cellulaire abondante dans le foie et relativement rare dans les organes lymphoïdes périphériques. Une fois matures, ces cellules expriment à leur surface le marqueur CD56 et sont responsables de la surveillance antitumorale et antivirale. Les NKs jouent ainsi un rôle majeur dans le contrôle d'une infection virale au niveau hépatique. Malgré l'absence de récepteur spécifique de l'antigène, elles possèdent la capacité de lyser la cellule infectée, et de sécréter des cytokines pour contenir l'infection virale. Elles expriment à leur surface des récepteurs, activateurs et inhibiteurs, leur permettant de détecter une expression anormale des molécules CMH de classe 1, souvent rencontrée dans les cellules infectées ou tumorales (Lanier 2008). Après détection par les NKs, ces cellules « anormales » sont lysées. Pour se faire, les NKs contiennent d'abondantes granulations cytoplasmiques composées de perforines et de granzymes, responsables de leur cytotoxicité. Différents mécanismes de cytotoxicité ont été mis en évidence : la cytotoxicité naturelle (ou constitutive) et la cytotoxicité médiée par la détection du domaine Fc des anticorps *via* le récepteur Fc (mécanisme ADCC). En plus de leur activité lytique, les NKs sécrètent des cytokines proinflammatoires et antivirales tels l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . Elles permettent de stimuler les macrophages, de recruter les lymphocytes T et B, et d'activer ainsi la réponse immunitaire adaptative (Krebs, Barnes et al. 2009). Il a également été montré que les NKs hépatiques pouvaient être impliqués dans divers processus physiopathologiques au niveau du foie telles les lésions hépatiques, la fibrose mais aussi la régénération (Chen, Wei et al. 2007).

Les **NKTs** sont des cellules dérivées des lymphocytes T qui expriment à leur surface le récepteur TCR (pour « T-Cell Receptor »), mais également des marqueurs de type NKs, comme CD161, CD94 (Balato, Unutmaz et al. 2009). Elles se distinguent des cellules NKs, par leur répertoire limité de reconnaissance des pathogènes et par leur TCR. Des données semblent montrer que ces cellules se développent dans le thymus, et migrent dans les

organes périphériques incluant la rate et le foie. Ces cellules jouent, dès lors, un rôle important dans la mise en place de l'immunité innée et adaptative contre une infection virale. Elles pourraient également être impliquées dans l'immunité antitumorale et les maladies auto-immunes (Peternel and Kastelan 2009). Des études récentes ont en effet démontré que les NKTs pouvaient moduler les réponses inflammatoires et l'état fibrotique du foie dans différentes affections hépatiques, telles les maladies métaboliques, les tumeurs hépatiques, les infections virales et les maladies auto-immunes (Xu, Yu et al. 2007).

### ***III.1.6 Les cellules dendritiques***

Les **mDCs** (cellules dendritiques myéloïdes) partagent de nombreuses caractéristiques avec les monocytes. Contrairement aux pDCs, elles sécrètent majoritairement de l'IL-12 et expriment préférentiellement les récepteurs TLR2 et TLR4. Elles permettent en effet le lien entre immunité innée et adaptative par leur fonction de cellules présentatrices de l'antigène (CPA), et participent ainsi à l'activation des NKs et des lymphocytes T pour réguler la mise en place d'une réponse innée et adaptative efficace (Della Chiesa, Romagnani et al. 2006).

Les **pDCs** (cellules dendritiques plasmacytoïdes) sont produites au niveau de la moelle osseuse et représentent moins de 0,5% des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) chez un individu sain. Ces cellules possèdent des senseurs de type TLR7, TLR8 et TLR9 capables de détecter les ARN et ADN viraux (cf. partie « Les Toll-Like-Receptors »). Ces senseurs sont situés dans les endosomes, donc les motifs viraux ne peuvent être détectés qu'après internalisation et digestion du virus. Bien que la plupart des cellules soient capables de produire des IFN de type I, ces cellules sont spécialisées dans la production d'IFN- $\alpha$  (~10pg d'IFN- $\alpha$  par cellule) en réponse à un pathogène (Fitzgerald-Bocarsly, Dai et al. 2008). Dans une moindre mesure, les pDCs peuvent aussi produire de l'IFN- $\beta$ , de l'IFN- $\kappa$  et de l'IFN- $\omega$ . Ces cellules sont également capables de sécréter de l'IL-6, du TNF- $\alpha$  ainsi que de chimiokines, telles CXCL10, RANTES et IL-8, afin d'établir un dialogue moléculaire avec les lymphocytes et l'inhibition de la réplication virale. Finalement, même si elle est inférieure aux mDCs, les pDCs possèdent également une activité de présentation de l'antigène (Kadowaki 2009).

Par ailleurs, il a été montré que les cellules dendritiques de type BDCA3+ étaient également capables de sécréter de l'IFN- $\lambda$  et qu'elles étaient les seules, parmi la population de DCs, à exprimer le récepteur aux IFN de type III (Yoshio, Kanto et al. 2012).

## **III.1.7 Les lymphocytes T CD4+, T CD8+ et Treg**

### **III.1.7.1 Les lymphocytes T CD4+**

A l'issue de leur activation par les CPA et sous l'influence des cytokines IL-12, IL-4, IL-6 et TGF- $\beta$ , les lymphocytes T CD4+ se différencient en trois sous-populations effectrices : les cellules Th1, Th2 et Th17. Ces sous-populations de lymphocytes se distinguent par leur différent profil de sécrétion cytokinique qui leur permet de promouvoir l'expansion clonale d'autres cellules immunitaires.

Les lymphocytes Th1 sont caractérisés par la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF- $\alpha$ . L'IFN- $\gamma$  permet tout d'abord l'activation des macrophages et augmente ainsi leur activité phagocytaire, l'expression des molécules CMH de classe I et II à leur surface, leur capacité à sécréter de l'IL-12 ainsi que leur production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour neutraliser l'infection virale. De plus, l'IFN- $\gamma$  favorise la commutation isotypique des immunoglobulines en IgG2A et, avec l'intervention de la cytokine IL-2, l'IFN- $\gamma$  promeut la différenciation des lymphocytes T CD8+ en lymphocytes T cytotoxiques (Tc). Quant aux lymphocytes Th2, ils sont caractérisés par la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 favorisant ainsi la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

Récemment, le paradigme Th1/Th2 a été étendu suite à la découverte de la sous-population Th17 (Bettelli, Korn et al. 2007). De par sa capacité à sécréter les interleukines IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22, la population Th17 a été caractérisée comme une sous population lymphocytaire proinflammatoire. Ainsi, ces cytokines stimulent les fibroblastes, les macrophages, les cellules endothéliales et épithéliales, et entraînent la production de multiples médiateurs proinflammatoires telles les cytokines IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ . Il a de plus été montré que les lymphocytes Th17 induisaient le recrutement de neutrophiles conduisant à une inflammation tissulaire massive (O'Quinn, Palmer et al. 2008).

### **III.1.7.2 Les lymphocytes T CD8+**

Contrairement aux lymphocytes T CD4+ qui jouent un rôle clé dans la régulation et la mise en place de l'immunité adaptative, les lymphocytes T CD8+ ont un rôle effecteur. Pour acquérir leur fonction effectrice, les lymphocytes T CD8+ doivent interagir avec les peptides viraux associés aux molécules CMH de classe I exposées à la surface des CPA. Dès lors, ces lymphocytes T effecteurs, également appelés T CD8+ cytotoxiques, permettent la mise en place de la réponse adaptative à médiation cellulaire. Ils peuvent en effet libérer par exocytose des cytotoxines, comme la perforine, formant des pores dans la cellule cible, ou encore des sérine-estérases qui activeront des caspases pour fragmenter l'ADN afin d'induire l'apoptose.

### III.1.7.3 Les lymphocytes T régulateurs

Parmi les lymphocytes T CD4+, il existe une sous population appelée lymphocytes T CD4+ CD25+ régulateurs (Treg) exprimant en particulier la chaîne  $\alpha$  du récepteur de la cytokine IL-2, ainsi que le facteur de transcription FoxP3 (Kaczorowski and Jutel 2013). Ces lymphocytes Treg comportent des propriétés immunosuppressives. Ils permettent en effet de réguler négativement l'activation du système immunitaire et jouent ainsi un rôle majeur dans le contrôle des mécanismes auto-immuns (Shevach 2002).

### III.1.8 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B participent à la mise en place de la réponse humorale grâce aux anticorps qu'ils produisent, et qui serviront à la reconnaissance spécifique et à la destruction de l'agent pathogène. *Via* la coopération avec les lymphocytes T CD4+ et à l'issue de l'infection, les lymphocytes B seront activés en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques (Jung and Pape 2002).

Les anticorps ou immunoglobulines solubles sont des hétéro-tétramères extrêmement polymorphiques au sein de l'individu, qui sont constitués de deux chaînes lourdes H et deux chaînes légères L liées entre elles de manière covalente par des ponts disulfures. Ces chaînes sont constituées de différentes régions variables au niveau du domaine de reconnaissance de l'antigène, assurant ainsi la spécificité de neutralisation d'un pathogène donné. Il existe différentes classes d'isotypes qui correspondent aux différents types d'immunoglobulines se distinguant les unes des autres par des changements de structure de la région constante de leurs chaînes, et n'affectant pas la spécificité de reconnaissance de l'épitope. On peut ainsi classer les Immunoglobulines en fonction du polymorphisme de la région constante de la chaîne lourde :

- Les **IgM** sont les premières immunoglobulines sécrétées par les plasmocytes suite à une primo-infection par un agent pathogène. La concentration sanguine des IgM diminue très rapidement pour être remplacée par d'autres isotypes. La structure pentamérique des IgM solubles leur procure un rôle efficace dans l'agglutination des antigènes, ainsi que dans l'activation du complément ; par contre, elles ne peuvent pas traverser le placenta.
- Les **IgG** sont les plus abondants des anticorps circulant et jouent ainsi un rôle important dans la détection de l'infection. Elles ont la caractéristique d'activer le complément ainsi que de passer aisément à travers les parois des vaisseaux sanguins et du placenta, procurant ainsi une défense immunitaire au fœtus.

- Les **IgA** jouent un rôle particulier au niveau des muqueuses (digestives, respiratoires, génito-urinaire,...), empêchant ainsi la fixation des agents pathogènes aux surfaces des cellules épithéliales.
- Les **IgE** jouent un rôle important dans les mécanismes allergiques, et ceci par la présence de récepteurs aux domaines constant des IgE à la surface de certaines cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation.

## III.2 L'interaction entre HBV et la réponse immunitaire adaptative

Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) sont des cellules essentielles à la mise en place de la réponse adaptative spécifique d'un pathogène donné. Dans le foie, elles sont majoritairement représentées par les cellules dendritiques et les cellules de Kupffer qui ont la capacité de phagocyter les particules virales, les antigènes viraux ainsi que les débris provenant des hépatocytes apoptotiques. Les CPA digèrent ces molécules en fragments peptidiques et les présentent à leur surface via des molécules CMH de classe I ou II pour activer respectivement les lymphocytes T CD8+ et T CD4+.

De par leur efficacité à présenter les antigènes viraux et à induire la différenciation des lymphocytes T naïfs, les cellules dendritiques sont considérées comme des CPA « professionnelles » faisant le lien entre l'immunité innée et adaptative. En effet, elles expriment 10 à 100 fois plus de complexe CMH/peptide à leur surface que les autres CPA de l'organisme. Après capture des antigènes viraux, les DCs migrent vers les organes lymphoïdes secondaires et se différencient en DCs matures pour acquérir leur fonction de CPA et activer les lymphocytes T et B.

### *III.2.1 Rôle des lymphocytes T CD4+ dans le contrôle de l'infection HBV*

Chez les patients, lors de la phase aiguë de l'hépatite, la réponse T CD4+ est cruciale pour le devenir de l'infection. En effet, une activation forte des lymphocytes T CD4+ dirigée contre divers épitopes dérivés des protéines virales HBc, HBs, HBe, HBx et Pol semble importante pour la clairance virale.

Plus particulièrement, lors d'une hépatite aiguë résolutive, le profil cytokinique observé est de type Th1 avec la production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF- $\alpha$  en l'absence d'IL-4 (Bertoletti and Ferrari 2012). Cependant, le rôle des lymphocytes T CD4+ dans la pathologie

HBV n'est pas parfaitement élucidé. En effet, une étude chez des chimpanzés infectés par HBV a montré que la réponse T CD4+ ne serait pas essentielle à la clairance virale puisque la déplétion de ces lymphocytes, quelques semaines après l'infection, ne modifierait pas le devenir de l'infection (Thimme, Wieland et al. 2003). Néanmoins, il n'est pas exclu que les lymphocytes T CD4+ aient joué un rôle plus précoce dans le contrôle de l'infection. Récemment, il a d'ailleurs été montré que l'activation précoce des lymphocytes T CD4+, lors de la propagation virale en début d'infection, était un élément décisif dans l'amplitude et la qualité de réponse des lymphocytes T CD8+ dirigée contre les épitopes HBV (Chisari, Isogawa et al. 2010). En effet, *via* les cytokines de type Th1 sécrétées, les lymphocytes T CD4+ pourraient participer au contrôle de l'infection en induisant l'expansion et le maintien de réponses cytotoxiques et humorales efficaces.

Cependant, le virus de l'hépatite B aurait également mis en place des mécanismes d'échappement en réprimant l'activation des lymphocytes T CD4+ de type Th1. En effet, l'antigène HBe est capable de supprimer les lymphocytes T CD4+ anti-HBc et anti-HBe par divers mécanismes apoptotiques Fas-dépendants (Milich and Liang 2003). En outre, en l'absence de production d'AgHBe, il a été observé une exacerbation des dommages hépatiques associée à une forte réponse immunitaire à médiation cellulaire, aboutissant parfois à la guérison des patients (Ganem and Prince 2004). Par ailleurs, le défaut d'activation des réponses innées et adaptatives, avec l'inhibition de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , pourrait être responsable de l'orientation des réponses T vers un profil cytokinique de type Th2 caractérisé par la production d'IL-4 et d'IL-10 (Dunn, Peppas et al. 2009; Bertoletti and Ferrari 2012). En effet, la cytokine immunosuppressive IL-10 est retrouvée en grande quantité chez les patients porteurs chroniques du HBV et contribuerait ainsi à l'inhibition des réponses adaptatives T et à la persistance de l'infection.

Récemment, diverses études ont suggéré un rôle central des lymphocytes de type Th17 dans l'induction d'une réponse inflammatoire dirigée contre HBV, et pouvant contribuer à la pathogénèse hépatique (Ge, Wang et al. 2010; Wu, Li et al. 2010). Il semble en effet que les niveaux de transaminases et de lésions hépatiques soient corrélés au niveau des réponses Th17 chez les patients porteurs chroniques (Zhang, Zhang et al. 2010). Plus particulièrement, sous l'effet immunomodulateur des antigènes du virus HBV, les mDCs sécrèteraient la cytokine IL-23, qui pourrait promouvoir l'expansion et maintenir la différenciation des lymphocytes Th17, participant ainsi aux dommages hépatiques dus à l'inflammation (Huang, van Velkinburgh et al. 2012).

### ***III.2.2 Rôle des lymphocytes T CD8+ dans le contrôle de l'infection HBV***

De part leur activité cytotoxique, les lymphocytes T CD8+ contribuent à l'élimination des hépatocytes infectés mais également à l'atteinte hépatique. D'une façon générale, lors de l'hépatite aiguë, les patients développent une réponse T CD8+ intense, polyclonale et multi-spécifique dirigée contre différents peptides dérivés des protéines virales HBc, HBs et Pol (Rehermann and Nascimbeni 2005). A l'inverse, les patients porteurs chroniques du HBV ne développent qu'une réponse T CD8+ faible et de spécificité épitopique limitée (Bertoletti and Ferrari 2012). Cette réponse, souvent accompagnée d'un infiltrat massif de cellules inflammatoires non spécifiques dans le foie à l'origine des lésions hépatiques, permet malgré tout de contenir l'infection virale (Bertoletti and Gehring 2006).

Plus particulièrement, le rôle de la réponse T CD8+ dans le contrôle de l'infection a été mis en évidence chez le chimpanzé (Thimme, Wieland et al. 2003). En effet, une corrélation a été établie entre l'accumulation des lymphocytes T CD8+, l'induction d'IFN- $\gamma$  et la clairance virale. Par ailleurs, la neutralisation des T CD8+ par des anticorps spécifiques retarderait la clairance virale et diminuerait les lésions hépatiques.

Plus particulièrement, la réponse T CD8+ comprendrait deux événements successifs. En effet, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'AgHBs induit tout d'abord la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et la disparition des ARN viraux dans un modèle murin (Guidotti, Ishikawa et al. 1996). En effet, cette cytokine inhibe l'expression des gènes viraux dans les hépatocytes infectés de manière non cytolytique. Ensuite, parallèlement à l'acquisition de leur capacité effectrice, les lymphocytes pourraient perdre leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$  et induiraient, dès lors, la lyse des cellules infectées grâce à leur activité cytotoxique (Isogawa, Kakimi et al. 2005).

Ces deux mécanismes d'action coordonnés ont également été confirmés chez le chimpanzé. En effet, le stade précoce de clairance virale est également associé à l'augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  au niveau du foie et à l'inhibition de l'expression des gènes viraux, et ceci en absence de lésions hépatiques importantes (Thimme, Wieland et al. 2003). De plus, une diminution de l'ADNccc peut également être observée lors de cette phase précoce de clairance virale, mettant ainsi en évidence le rôle antiviral de cette cytokine au niveau de l'ADNccc (Chisari, Isogawa et al. 2010). A l'inverse, le stade plus tardif de clairance virale est associé à une activité cytotoxique importante médiée par les lymphocytes T effecteurs, à l'apparition d'atteintes hépatiques et à une régénération hépatocytaire importante.



De façon identique, ces données ont été confirmées chez la marmotte et le canard de Pékin où la résolution de l'infection aiguë est également associée à l'augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8+, soulignant ainsi le rôle majeur du mécanisme non cytolytique dans le contrôle de l'infection virale (Narayan, Buronfosse et al. 2006). En effet, ce mécanisme permet l'élimination des formes répliquantes virales en conservant l'intégrité du tissu hépatique. Plus particulièrement, *via* un processus dépendant du protéasome, l'IFN- $\gamma$  pourrait inhiber la formation des capsides et ainsi déstabiliser l'ARNpg (Robek, Boyd et al. 2004).

Cependant, divers études indiquent que le virus HBV aurait mis en place des stratégies pour inhiber l'activation des lymphocytes T CD8+.

En effet, une corrélation inverse entre la charge virale et la mise en place des réponses T a été démontrée chez les patients porteurs chroniques du HBV. Il est en effet possible que le statut de tolérance immunologique soit lié à la charge virale. Plus particulièrement, chez les patients hautement virémiques, les lymphocytes T CD8+ ont une capacité de prolifération et de sécrétion d'IL-2 diminuée, aboutissant à la perte de leur fonction antivirale. Cette anergie fonctionnelle est liée à la stimulation prolongée des lymphocytes T par les antigènes HBe et HBs au cours de l'infection chronique, et peut même conduire à leur déplétion (Michel, Deng et al. 2011).

En outre, il est acquis que le récepteur inhibiteur PD-1 (pour « Programmed Death 1 ») est surexprimé à la surface des lymphocytes T, et ceci de façon proportionnelle à la charge virale (Fisicaro, Valdatta et al. 2010). Le ligand PD-L1 est exprimé de façon constitutive par les CPA du foie, et de façon inductible par les hépatocytes lors d'une infection chronique. L'interaction PD-1/PD-L1 entraîne dès lors une diminution des fonctions effectrices des lymphocytes T, inhibant leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$  au niveau hépatique. De plus, la surexpression de ce récepteur PD-1 bloque la différenciation des lymphocytes T en cellules mémoires.

Par ailleurs, les lymphocytes T CD8+ surexpriment des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, telle que BIM, initiant ainsi l'apoptose de ces cellules chez les patients porteurs chroniques du HBV (Lopes, Kellam et al. 2008). La cytokine IL-10 retrouvée en grande quantité dans le sérum des patients inhiberait également la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des lymphocytes T CD8+. En effet, dans le modèle de la souris infectée par le virus LMCV, l'inhibition de la sécrétion d'IL-10 permettrait de rétablir les fonctions antivirales des lymphocytes T CD8+ épuisés lors de l'infection chronique HBV (Brooks, Ha et al. 2008).

### ***III.2.3 Rôle des lymphocytes T régulateurs dans le contrôle de l'infection HBV***

La fréquence des Treg au sein du foie et des PBMC est augmentée chez les porteurs chroniques du HBV (Xu, Fu et al. 2006). Ces lymphocytes T régulateurs inhiberaient la prolifération des lymphocytes T spécifiques des antigènes viraux ainsi que la production d'IFN- $\gamma$ . Par ailleurs, la diminution de la charge virale induite par les traitements à base d'Adéfovir ou d'Entécavir conduit également à la baisse du nombre de Treg chez les patients. Ce phénomène serait concomitant avec la restauration partielle de la réponse immune dirigée contre HBV chez ces patients. Ces données témoignent ainsi de l'implication de cette sous population lymphocytaire dans l'inhibition de la réponse adaptative dirigée contre HBV et dans la persistance virale (Zhang, Song et al. 2010).

### ***III.2.4 Rôle des lymphocytes B dans le contrôle de l'infection HBV***

Suite à l'infection par le virus de l'hépatite B, les lymphocytes B activés acquièrent leur fonction effectrice en se différenciant en plasmocytes. Dès lors, ils produisent des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines virales. Selon le stade de l'infection, la spécificité et l'isotype des anticorps produits évoluent. Plus particulièrement, la présence des immunoglobulines IgM anti-HBc témoigne du caractère précoce de l'infection. Cependant, le rôle de ces anticorps n'est pas totalement élucidé puisqu'ils sont également retrouvés dans le sérum des patients en phase chronique d'infection. L'apparition des anticorps anti-HBe corrèle avec la diminution de la charge virale, voir l'arrêt de la réplication. La détection des anticorps anti-HBs est associée à la disparition de l'AgHBs et au contrôle immunologique de la maladie à long terme. Les anticorps anti-HBs sont sécrétés très tôt après les premiers symptômes de l'infection et sont rapidement complexés avec les particules virales et subvirales produites en grande quantité dans le sérum des patients (Bocher, Herzog-Hauff et al. 1999). Ainsi, ils permettent d'éliminer les virions circulants et d'empêcher leur internalisation dans de nouveaux hépatocytes. Après la guérison, ces anticorps perdurent dans l'organisme pendant de nombreuses années et confèrent ainsi une immunité protectrice contre une infection ultérieure. Ils sont également à la base des vaccins prophylactiques encore utilisés aujourd'hui contre HBV.

## III.3 L'interaction entre le virus HBV et la réponse immunitaire innée

### III.3.1 L'activation du système immunitaire innée

Les interactions hôtes/pathogènes peuvent conduire à la mise en place d'un état antiviral dans l'hépatocyte infecté et à la sécrétion de cytokines/chimiokines permettant d'alerter les cellules immunitaires spécialisées comme les NKs, NKTs et KCs, ou non spécialisées comme les hépatocytes encore non infectés. La mise en place d'une réponse innée efficace est primordiale pour contrôler les étapes précoces de l'infection virale, l'activation de la réponse adaptative et par conséquent le devenir de l'infection.

#### III.3.1.1 Le système de détection des pathogènes médié par les PRRs

La détection de l'infection virale est essentielle pour la mise en place et la coordination des mécanismes de défense. Pour se faire, il existe des senseurs présents sur toutes les cellules immunocompétentes de l'organisme, spécialisées ou non : les PRRs (pour « Pathogen Recognition Receptor »). Ce sont des récepteurs cytoplasmiques ou transmembranaires reconnaissant des motifs microbiens conservés appelés PAMPs (pour « Pathogen Associated Molecular Patterns »). Les PAMPs peuvent être de différentes natures (protéines, sucres, acides nucléiques) et d'origines diverses (bactéries, champignons, virus).

Parmi les PRRs, on peut distinguer plusieurs familles selon leur localisation et leur spécificité de reconnaissance. Ainsi, les virus sont majoritairement reconnus par les TLRs, les RLRs, les senseurs cytoplasmiques à ADN et l'inflammasome (Thompson and Iwasaki 2008; Kumar, Kawai et al. 2011). Cependant, même si les PRRs sont requis pour la mise en place d'un programme de défense, de nombreux virus ont également mis en place des stratégies de détournement des fonctions antivirales de ces senseurs à leur propre profit.

##### III.3.1.1.1 Les Toll-Like-Receptors (TLRs)

Les Toll-like-receptors (TLRs) sont à l'heure actuelle la classe des PRRs la mieux caractérisée. Le premier TLR a été mis en évidence chez la drosophile en 1996 (Lemaitre, Nicolas et al. 1996). Chez l'homme, 10 membres ont été jusqu'à aujourd'hui identifiés (12 chez la souris). TLR1 à -9 sont ainsi conservés chez l'homme et la souris, alors que TLR10 est spécifique de l'homme. Même si certains TLRs sont encore peu connus (TLR10 pour

l'homme, TLR11,-12 et -13 chez la souris), beaucoup d'avancées ont été réalisées dans le domaine de l'immunité innée grâce à la caractérisation de cette famille.

Les TLRs sont des glycoprotéines transmembranaires de type I et comportent au niveau extracellulaire un domaine LRR (pour « Leucine Rich Repeats ») et au niveau intracellulaire un domaine TIR (pour « Toll/Interleukin-1 Receptor ») (figure 24). Le domaine LRR est nécessaire à la détection des PAMPs alors que le domaine TIR est impliqué dans la transduction du signal après activation (Kawai and Akira 2010).

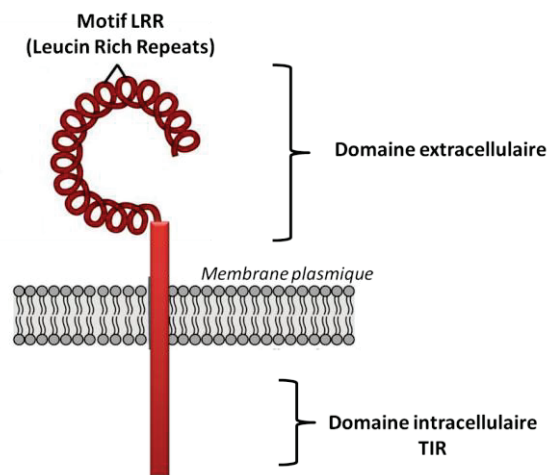


FIGURE 24 : ORGANISATION STRUCTURALE D'UN TLR

### ***Distribution cellulaire des TLRs :***

Même si de nombreux TLRs sont exprimés dans les cellules parenchymales et non parenchymales du foie, la distribution des TLRs n'est pas identique selon le type cellulaire et permet la reconnaissance d'un spectre large d'agents infectieux (Zarembek and Godowski 2002). Cette distribution assure ainsi une reconnaissance spécifique des pathogènes par un type cellulaire donné ainsi qu'une réponse cytokinique adaptée.

Plus particulièrement, les hépatocytes expriment les ARNm de tous les TLRs (TLR1-10) (Nishimura and Naito 2005), alors que les cellules de Kupffer expriment préférentiellement TLR2 et TLR4 (Ojaniemi, Liljeroos et al. 2006). Les lymphocytes T et les cellules NKs expriment plutôt TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR9 alors que les lymphocytes B expriment TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 et TLR10 (Hornung, Rothenfusser et al. 2002). Au niveau des cellules dendritiques, les pDCs expriment préférentiellement TLR7 et TLR9 alors que les mDCs expriment plutôt TLR2, TLR3, TLR4 et TLR9 (Vogel, Fitzgerald et al. 2003). Quant aux cellules endothéliales, elles expriment plus particulièrement TLR3 et TLR4. De façon intéressante, la voie TLR4, dans les LSECs, pourrait également être impliquée dans l'immunotolérance hépatique (Uhrig, Banafsche et al. 2005) (tableau 1).

TYPES CELLULAIRES	DISTRIBUTION DES TLRs
Hépatocytes	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10
Cellules endothéliales	TLR3, TLR4
Macrophages	TLR2, TLR4
Cellules NKs	TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9
Cellules dendritiques plasmacytoïdes	TLR7, TLR9
Cellules dendritiques myéloïdes	TLR2, TLR3, TLR4, TLR9
Lymphocytes T	TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9
Lymphocytes B	TLR1, TLR6, TLR7, TLR9, TLR10

TABLEAU 1 : DISTRIBUTION DES SENSEURS TLRs SELON LE TYPE CELLULAIRE

### ***Localisation subcellulaire et spécificité de reconnaissance des TLRs :***

De plus, au niveau intracellulaire, chaque TLR possède une spécificité de localisation, de reconnaissance et de signalisation. Ainsi, TLR1, -2, -4, -5 et -6 sont exprimés à la surface des cellules et reconnaissent des motifs de type protéique bactériens, viraux et fongiques, alors que TLR3, -7, -8 et -9 sont exprimés dans les compartiments endosomaux et reconnaissent plus particulièrement les acides nucléiques dérivés de virus et bactéries. Il a également été montré que TLR4 pouvait être retrouvé au niveau des compartiments intracellulaires (Kumar, Kawai et al. 2011). Par ailleurs, les TLR1, -2 et -6 seraient retrouvés sous forme d'hétérodimères TLR1/2 et TLR2/6. De la même façon, TLR10 pourrait s'hétérodimériser avec TLR1 et -2 (Hasan, Chaffois et al. 2005) (figure 25).

Plus particulièrement, TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont retrouvés au niveau du RE, des endosomes, des lysosomes et des endolysosomes (Blasius and Beutler 2010). Les senseurs TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont séquestrés, à l'état inactif, dans le RE. *Via* l'appareil de Golgi, ils migrent ensuite vers les endosomes jusqu'à reconnaissance d'un PAMP spécifique qui induira leur dimérisation au niveau des compartiments endolysosomaux. Différentes protéases lysosomales (cathepsines, endopeptidases) cliveront leur partie N-terminale pour initier la transduction du signal (Ewald and Barton 2011; Toscano, Estornes et al. 2013). Cette localisation intracellulaire facilite la reconnaissance d'acides nucléiques provenant de l'internalisation de virus et d'autres pathogènes. Ainsi, les acides nucléiques viraux de type ADN et ARN (simple ou double brin(s)) peuvent être reconnus par ces différents senseurs.

A l'inverse, les acides nucléiques du soi présents dans le milieu extracellulaire, rapidement dégradés par diverses nucléases, ne peuvent pas avoir accès à ces

compartiments intracellulaires. Dès lors, ceci prévient de la mise en place de processus auto-immun par réaction contre des acides nucléiques du « soi ».

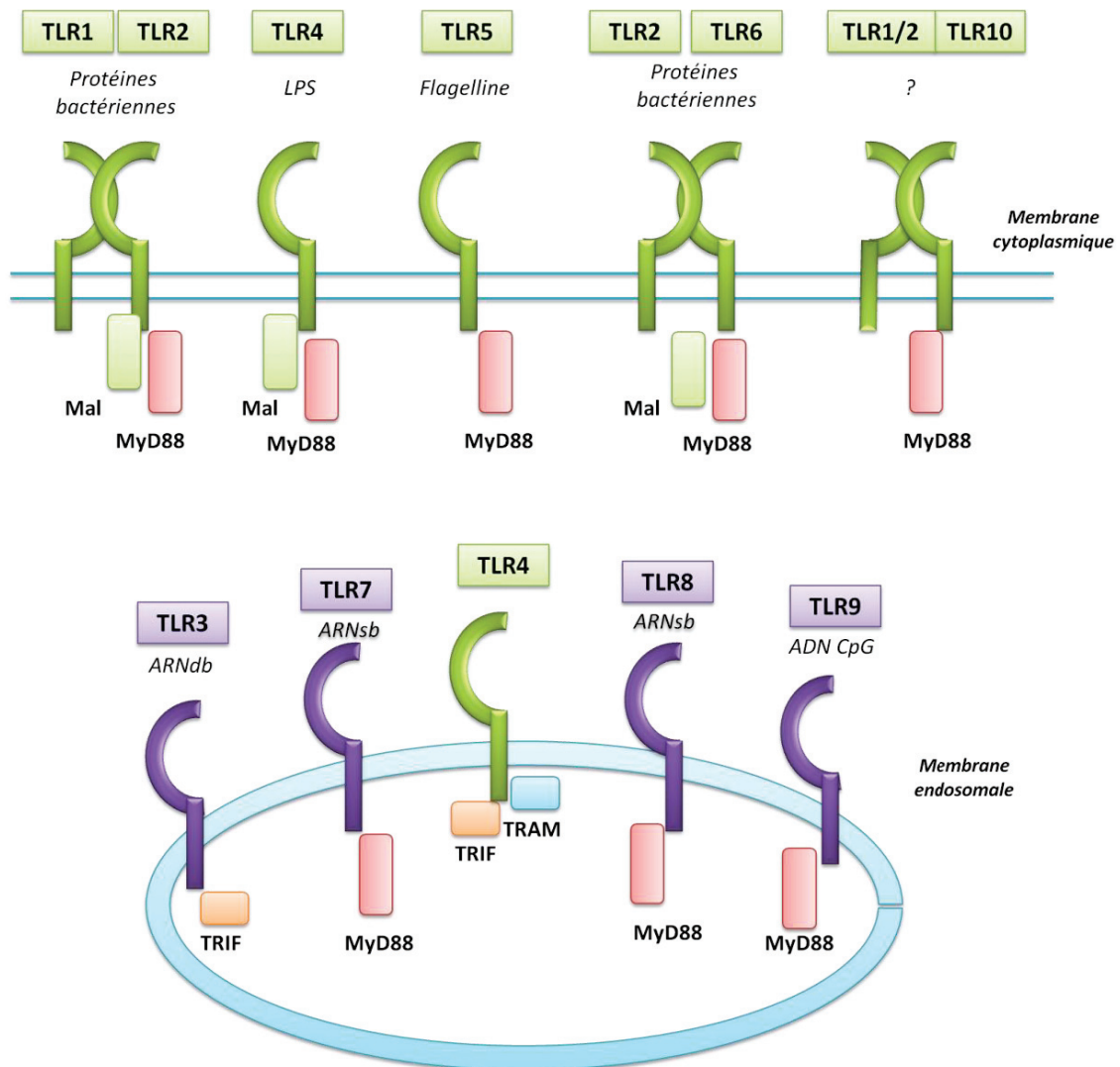


FIGURE 25 : DISTRIBUTION CELLULAIRE ET SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE DES TLRs

Les senseurs TLR1, TLR2, TLR5 et TLR6 sont localisés au niveau de la membrane cytoplasmique et reconnaissent des motifs protéiques viraux, bactériens ou fongiques. Les senseurs TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont situés au niveau de la membrane endosomale et reconnaissent plus particulièrement des motifs dérivés d'acides nucléiques viraux et bactériens. Le senseur TLR4, reconnaissant des motifs protéiques, est situé au niveau de la membrane cytoplasmique à l'état basal. Dans le cas d'une activation de TLR4 *via* la voie dépendante de TRIF, il migrera au niveau de la membrane endosomale pour transduire le signal. Contrairement aux autres TLRs qui s'homodimérisent, les senseurs TLR1, TLR2, TLR6 et TLR10 doivent former des hétérodimères (TLR1/2, TLR2/6, TLR1/10 ou TLR2/10) pour acquérir leur fonctionnalité.

## ***Les senseurs des acides nucléiques viraux et bactériens :***

- **TLR3 : senseur à ARN simple et double brins**

L'ARN simple brin (ARN sb) et double brins (ARN db), ainsi que le ligand synthétique Poly(I:C), peuvent conduire à l'activation de la réponse IFN et proinflammatoire *via* le senseur TLR3 localisé dans les endosomes. Le fait que TLR3 puisse également répondre à un ligand ARN double brins lui donne un spectre d'action antivirale assez large, avec la possibilité de détecter des virus à ADN générant de l'ARN db pendant la transcription bidirectionnelle des brins d'ADN viraux opposés.

Ainsi, TLR3 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'infection par le virus MCMV à ADN db (pour « Mouse CytoMegaVirus »). Différentes études ont en effet montré que, dans des modèles murins déficients pour TLR3, la production d'IFN- $\beta$  et d'IL-12 serait diminuée, et ceci de façon concomitante avec l'augmentation de la charge virale (Tabeta, Georgel et al. 2004). Dans le cas du virus de l'herpès simplex HSV-1, à ADN db, les patients possédant des mutations au niveau du gène TLR3 seraient plus sensibles aux encéphalites viro-induites, complications mortelles de l'infection par le virus HSV-1 (Zhang, Jouanguy et al. 2007).

La signalisation TLR3 pourrait également contrôler la réplication des virus à ARN sb tels que le virus EMCV (pour « EncephaloMyoCarditis Virus »). En effet, l'infection par le virus EMCV dans des souris déficientes pour TLR3 induirait plus faiblement l'expression des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$ , en comparaison avec les souris sauvages exprimant TLR3, et ne pourraient donc pas contrôler le niveau de réplication virale dans le tissu cardiaque (Hardarson, Baker et al. 2007).

Cependant, l'activation de la signalisation TLR3 pourrait, par ailleurs, être délétère pour l'hôte dans certaines infections virales. Ainsi, des modèles murins déficients pour TLR3 seraient protégés des dommages cérébraux induits par les virus West Nile (WNV) et Punta Toro (PTV) à ARN sb. En effet, l'inflammation induite par TLR3 endommagerait la barrière encéphalique et faciliterait ainsi l'accès du virus WNV au cerveau. De la même manière, l'inflammation dépendante de TLR3 produite en réponse à l'infection par le virus PTV, serait également responsable des dommages observés chez l'hôte (Gowen, Hoopes et al. 2006).

- **TLR7 et TLR8 : senseur à ARN simple et double brins**

Les senseurs TLR7 et TLR8 sont situés au niveau des compartiments endosomaux. Les senseurs TLR7 et TLR8, retrouvés au niveau des endosomes, peuvent également reconnaître les ARN viraux, ainsi que les ligands synthétiques Imiquimod et Resiquimod (analogues de bases). Même si ces récepteurs sont assez proches en termes de reconnaissance et de



spécificité, certains motifs ARN double brins activeraient préférentiellement la voie TLR7. De plus, des agonistes spécifiques de TLR7 induiraient une réponse cytokinique différente de celle induite par des agonistes spécifiques de TLR8 dans les cellules immunitaires innées (Gorden, Gorski et al. 2005).

Plus particulièrement, le virus Influenza (ARN sb) pourrait être reconnu par TLR7 qui activerait la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDCs. Les pDCs seraient ainsi capable d'internaliser et de dégrader l'ARN viral, avant que ce dernier soit reconnu par TLR7 au niveau endosomale (Diebold, Kaisho et al. 2004). Le récepteur TLR7 est également requis pour la reconnaissance du virus Sendai (SeV) à ARN sb, et *in fine* pour la production d'IFN- $\alpha$  par les pDCs en réponse à l'infection.

Contrairement au virus Influenza, l'inactivation du virus SeV, par un traitement UV, abolit la reconnaissance du virus par TLR7. Une des hypothèses émises serait que l'ARN simple brin produit lors de la réplication virale pourrait être transféré du compartiment cytoplasmique au compartiment lysosomal *via* un mécanisme d'autophagie, avant d'être exposé au senseur TLR7 (Lee, Lund et al. 2007).

Les senseurs TLR7 chez la souris et TLR8 chez l'homme pourraient également être impliqués dans la reconnaissance de l'ARN simple brin du virus HIV, qui induirait *in fine* la production des cytokines IFN- $\alpha$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  par les PBMC murins et humains respectivement (Heil, Hemmi et al. 2004). Ces données témoignent ainsi de la spécificité de reconnaissance des récepteurs TLRs selon l'espèce.

- **TLR9 : senseur à ADN de séquences CpG**

Chez l'homme et la souris, TLR9 est préférentiellement exprimé au niveau des pDCs capables de sécréter rapidement des quantités importantes d'IFN- $\alpha$  en réponse à une infection. Le senseur TLR9 reconnaît les séquences d'ADN CpG non méthylées virales et bactériennes (Gilliet, Cao et al. 2008).

Dans les infections virales, des souris déficientes pour TLR9 seraient hautement sensibles à l'infection par le virus MCMV. Cette hypersensibilité résulterait de l'inhibition de la production des IFN de type I et de l'IL-12 par les pDCs, mais également de l'absence d'activation des cellules NKs suite à l'infection (Tabeta, Georgel et al. 2004). Lors de l'infection par le virus HSV-2 dans un modèle murin, TLR9 jouerait également un rôle primordial dans le contrôle de l'infection par la sécrétion d'IFN- $\alpha$  médiée par les pDCs (Lund, Sato et al. 2003).

En outre, au niveau des monocytes, la voie TLR2 pourrait également synergiser avec la voie TLR9 pour induire une réponse cytokinique adaptée (IFN- $\alpha$ , IL-6 et IL-8) en réponse à l'infection EBV (Fiola, Gosselin et al. 2010).

### ***Les senseurs des protéines virales et bactériennes :***

- **TLR4 : senseur protéique**

Le senseur TLR4 est un récepteur transmembranaire situé au niveau de la membrane cytoplasmique. En plus des acides nucléiques, les protéines virales peuvent également jouer le rôle de PAMPs.

Ainsi, de la même façon que le LPS, les protéines d'enveloppe des virus RSV (pour « Respiratory Syncytial Virus ») et MMTV (pour « Mouse Mammary Tumor Virus ») pourraient être détectées par TLR4. Plus particulièrement, la protéine F du virus RSV interagirait avec TLR4 pour induire, *via* la voie NF $\kappa$ B, la production d'IL-6 au niveau des PBMC et contrôler l'infection (Rallabhandi, Phillips et al. 2012).

Cependant, dans le cas du rétrovirus MMTV, l'activation de la signalisation médiée par TLR4, par la protéine ENV, serait bénéfique pour le virus en induisant la maturation et la division cellulaire des lymphocytes B nécessaires à l'intégration du génome virale dans l'ADN de l'hôte; l'activation de TLR4 induirait également l'inhibition de la réponse immunitaire, *via* la sécrétion de la cytokine immunosuppressive IL-10, nécessaire à la persistance de l'infection dans des modèles transgéniques murins (Rassa, Meyers et al. 2002). L'activation de la signalisation TLR4 serait également délétère dans l'infection par les virus HCMV (pour « Human CytoMegalovirus »). En effet, le virus HCMV pourrait être reconnu par le senseur TLR4 au niveau des macrophages, ce qui activerait leur prolifération nécessaire à la réplication virale (Arcangeletti, Germini et al. 2013).

- **TLR2 : senseur protéique**

La forme active du récepteur TLR2 est retrouvée sous forme d'hétérodimères TLR2/TLR6 ou TLR2/TLR1, nécessaires à son activité, au niveau de la membrane cytoplasmique.

*In vivo*, il semblerait que le complexe TLR2/TLR6 reconnaisse certaines protéines virales du RSV, et joue ainsi un rôle dans le contrôle de l'infection. En effet, des macrophages déficients pour les récepteurs TLR2 et/ou TLR6 n'indui raient qu'une faible sécrétion de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, RANTES et MCP1) par rapport aux macrophages exprimant ces TLRs, en réponse à l'infection (Murawski, Bowen et al. 2009). TLR2, exprimé sur les PBMC, participerait également à la production de MCP1 et d'IL-8 en réponse au virus EBV (Fiola,

Gosselin et al. 2010). Par ailleurs, les protéines d'enveloppe B et H du cytomégalo virus humain (HCMV) pourraient également être reconnues par le complexe TLR2/TLR1 dans des cellules épithéliales, et induire la production des cytokines proinflammatoires IL-8 et IL-6 (Boehme, Guerrero et al. 2006).

De façon intéressante, dans le cas du virus LCMV, l'activation de la signalisation TLR2 permettrait l'induction de l'immunité innée et adaptative avec la sécrétion des cytokines et chimiokines TNF- $\alpha$ , IFN de type I, RANTES et MCP1, mais participerait également aux dommages cellulaires observés au niveau du système nerveux central du fait de cette inflammation (Zhou, Cerny et al. 2010). De la même façon, TLR2 pourrait également jouer un double rôle, protecteur et délétère, dans le cas de l'infection par le virus de l'herpès simplex (HSV), selon la localisation de l'infection. Ainsi, l'activation de la réponse IFN de type I médiée par la signalisation de TLR2 permettrait le contrôle précoce de la réplication virale, et empêcherait dès lors de la dissémination du virus HSV du tractus génital au cerveau, mais cette inflammation deviendrait rapidement délétère pour l'hôte au niveau cérébral (Kurt-Jones, Chan et al. 2004; Sorensen, Reinert et al. 2008). La dichotomie d'action de la signalisation TLR2 est également retrouvée dans le cas de l'infection par le virus de la rougeole (MV). La protéine HA du virus MV, reconnue par TLR2, induirait d'une part la sécrétion d'IL-6, mais également l'internalisation du virus, en induisant l'expression de la molécule CD150, à la surface des macrophages, nécessaire à son entrée (Bieback, Lien et al. 2002).

### ***Signalisation intracellulaire des TLRs :***

La signalisation TLR induit tout d'abord le recrutement de différents adaptateurs au niveau du domaine TIR. Parmi ces protéines, on peut citer Myd88, TRIF, MAL/TIRAP et TRAM. Le recrutement de ces adaptateurs active plusieurs facteurs de transcription (NF $\kappa$ B, IRF1/3/5/7 et les MAP kinases) qui induisent, à leur tour, l'expression des gènes impliqués dans les réponses IFN de type I/III, les réponses proinflammatoires, ainsi que dans la différenciation cellulaire et l'apoptose (Kumar, Kawai et al. 2011).

Plus particulièrement, les TLRs, à l'exception de TLR3, initient une cascade de signalisation, en recrutant Myd88 pour activer NF $\kappa$ B et les MAP kinases, induisant dès lors la sécrétion de cytokines proinflammatoires dans les macrophages, les DCs et dans d'autres cellules non spécialisées immunocompétentes. Dans le cas de TLR2 et TLR4, la protéine MAL/TIRAP est nécessaire au recrutement de Myd88. Le « domaine de mort » de Myd88 s'associe et active IRAK1 et/ou IRAK2. Parallèlement, IRAK4 interagit avec ce complexe néoformé et induit la phosphorylation d'IRAK1, qui engagera à son tour le facteur TRAF6 dans la transduction du signal. TRAF6 pourra, dès lors, poly-ubiquitiner (au niveau de la lysine 63) d'autres protéines de la voie telles que NEMO, TAK1 et TAB1/2/3. NEMO forme ainsi un complexe avec les kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  afin d'induire la phosphorylation de I $\kappa$ B,

facteur séquestrant NFκB au niveau du cytoplasme. IκB est ensuite ubiquitiné pour migrer vers le protéasome et être dégradé, permettant ainsi la translocation du facteur NFκB dans le noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles. Par ailleurs, TAK1 joue un rôle essentiel dans l'activation de la voie NFκB, mais aussi celle des MAPK, en phosphorylant les kinases IKK et JNK respectivement.

TLR3 recrute TRIF pour transduire son signal d'activation. L'adaptateur TRIF interagit directement avec TRAF6 pour induire la voie NFκB de la même manière que la voie de signalisation dépendante de MyD88. Contrairement à MyD88, TRIF peut également recruter RIP1, et synergise ensuite avec TRAF6 pour augmenter la transduction du signal de cette voie. Finalement, TRIF peut également interagir avec TRAF3, qui s'associera avec TBK1 et IKKi pour induire la phosphorylation des facteurs IRF3 et IRF7, et ainsi leur dimérisation/translocation dans le noyau. Avec la coopération de NFκB et AP1, les dimères IRF3 et IRF7 pourront activer l'expression des IFN de type I. Les pDCs sont les seules cellules de l'organisme à exprimer de façon constitutive IRF7, ce qui leur donne l'avantage de pouvoir répondre rapidement à une infection en produisant de l'IFN-α (Honda, Yanai et al. 2005).

TLR4 peut également transduire un signal d'activation *via* les adaptateurs TRIF et TRAM. Dans ce cas, une fois activé, TLR4 peut migrer vers les endosomes par endocytose pour former le complexe TLR4-TRIF-TRAM nécessaire au recrutement de RIP1, et *in fine* activer les facteurs IRF3, NFκB mais aussi la voie des MAPK. L'activation de la voie TLR4 dépendante de TRIF permettra l'expression des IFN de type I et des cytokines proinflammatoires (figure 26).

L'adaptateur TRAF3 permet également la régulation entre les voies de signalisation dépendantes de Myd88 et celles dépendantes de TRIF. En effet, la dégradation de TRAF3 par ubiquitination active la voie de signalisation dépendante de Myd88 au détriment de TRIF. De plus, la protéine NRDP1, une E3 ligase, est capable d'interagir avec TBK1 pour également réguler l'activation de ces deux voies. La cellule aurait ainsi mis en place un mécanisme régulant l'activation des deux voies pour éviter une surproduction néfaste de cytokines proinflammatoires pendant une infection virale.

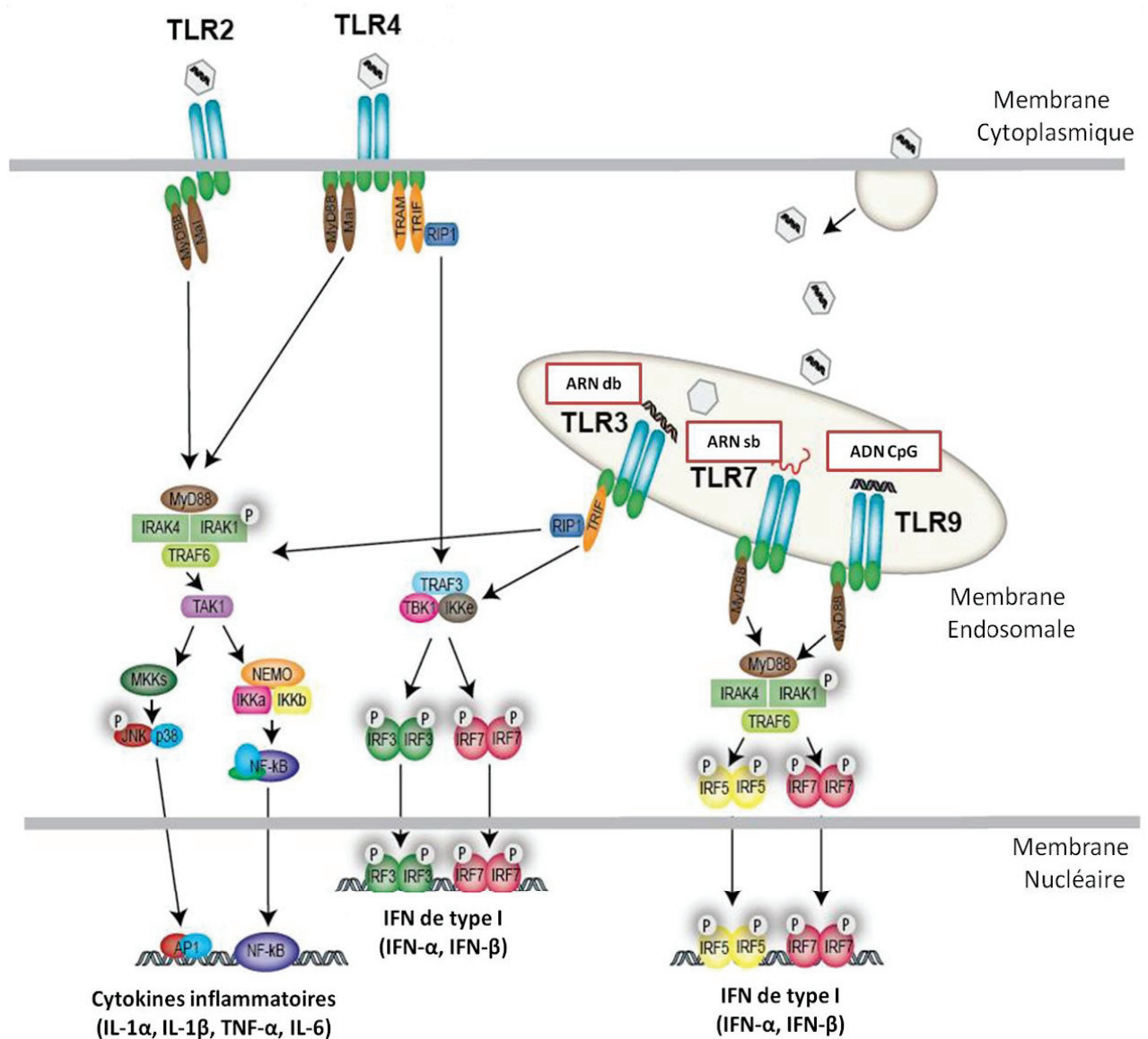


FIGURE 26 : LES VOIES DE SIGNALISATION MEDIEES PAR LES TLRs (ADAPTEE DE THOMPSON ET AL. 2011)

Le senseur TLR2 répond à une variété de virus en activant les voies de signalisation NFκB et MAPK dépendantes de MyD88. Le senseur TLR4 transduit le signal d'activation de façon dépendante ou indépendante de MyD88. L'activation dépendante de MyD88 induit l'expression des cytokines proinflammatoires, alors que la transduction du signal indépendante de MyD88, régulée par TRAM/TRIF et les kinases IKK induisant l'activation des IRFs, permet l'expression des IFN de type I. Au niveau des endosomes, TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 reconnaissent des acides nucléiques et activent, via IRF3 et/ou IRF7, l'expression des IFN de type I.

### III.3.1.1.2 Les RIG-I-Like-Receptors (RLRs)

Les RLRs, appartenant à la famille des « DExD/H box RNA helicases », regroupent plusieurs senseurs à ARN localisés au niveau du cytoplasme. On distingue ainsi les senseurs RIG-I, MDA5, DDX3 et LGP2 capables d'activer une réponse IFN de type I et III, ainsi qu'une réponse proinflammatoire (Kumar, Kawai et al. 2011) (figure 27).

L'activation de RIG-I et MDA5 par des PAMPs viraux de type ARN induit des modifications conformationnelles au niveau des senseurs, exposant ainsi leur domaine CARD à la lumière du cytoplasme et permettant leur dimérisation. Ce domaine CARD en position N-terminale est essentiel à la transduction du signal. Les RLRs peuvent dès lors interagir avec l'adaptateur IPS-1 (également nommé MAVS, CARDIF ou VISA), localisé au niveau mitochondrial, mais également au niveau des peroxysomes. L'adaptateur IPS-1, situé au niveau des peroxysomes, induirait de façon précoce l'expression des ISGs *via* IRF1, alors que l'adaptateur IPS-1 mitochondrial induirait d'avantage une réponse antivirale tardive *via* IRF3 (Dixit, Boulant et al. 2010). Suivant l'activation d'IPS-1, il y a recrutement des kinases IKKi et TBK1 pour activer, *in fine*, les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 induisant une réponse IFN de type I et III. IPS-1 peut également activer la voie NFkB à travers le recrutement de TRADD, FADD et des caspases 8 et 10.

Les RLRs reconnaissent des virus à ARN appartenant à diverses familles virales, et présentant donc des intermédiaires ARN de tailles et de structures différentes.

- **RIG-I**

Le senseur **RIG-I** (retinoic acid-inducible gene 1) pourrait détecter des paramyxovirus comme les virus NDV (pour « New Castle Disease Virus ») et VSV (pour « Vesicular Stomatitis Virus »), ainsi que les virus RSV, SV, MV et Influenza, et activer *in fine* l'immunité innée cellulaire. Une déficience au niveau du senseur RIG-I induit dès lors une diminution de la production des cytokines proinflammatoires et des interférons (Kato, Sato et al. 2005). De plus, RIG-I serait également capable de reconnaître des virus appartenant à la famille des flaviviridae tels les virus HCV et JEV (pour « Japanese Encephalitis Virus »). Des ligands synthétiques ARN peuvent également être à l'origine de l'activation du senseur RIG-I. Ainsi, l'ARN simple brin exposant un triphosphate en 5' est un ligand permettant une stimulation optimale du senseur RIG-I (Pichlmair, Schulz et al. 2006). De récentes études ont également montré que la structure ARN double brins, générée lors de l'étape de synthèse des ARN viraux, pouvait également être reconnue par RIG-I (Schmidt, Schwerd et al. 2009).

- **MDA5**

A l'inverse, le senseur **MDA5** (Melanoma Differentiation-Associated protein 5) pourrait détecter certains membres de la famille des picornaviridae comme le poliovirus ou encore le virus EMCV (pour « Encephalomyocarditis Virus ») (Loo, Fornek et al. 2008). MDA5 serait également capable de reconnaître des ARN doubles brins synthétiques de type Poly(I:C) au niveau intracellulaire.

De façon intéressante, les ARN doubles brins de petite taille sont préférentiellement reconnus par RIG-I alors que les plus longs activeraient plutôt MDA5. Le senseur MDA5 serait ainsi capable de reconnaître également le virus Mango. L'ARN de ce virus n'est pas triphosphaté en 5', mais ces intermédiaires de réplication sont assez longs pour être détectés par MDA5. Contrairement à RIG-I, MDA5 discriminerait ainsi les ARN viraux des ARN du soi par leur taille, et non pas par leur extrémité 5'ppp. Ceci expliquerait également la spécificité de reconnaissance de RIG-I et de MDA5 en fonction des familles virales. En outre, certains virus tels les virus de la Dengue et le « West Nile Virus » peuvent activer RIG-I et MDA5 générant ainsi une réponse antivirale plus robuste (Kato, Takeuchi et al. 2008).

- **LGP2**

Contrairement aux senseurs RIG-I et MDA5, **LGP2** (Laboratory of Genetics and Physiology 2) ne possède pas de domaine CARD essentiel à la transduction du signal. LGP2 a un rôle encore controversé mais pourrait avoir une fonction inhibitrice dans la signalisation induite par les voies RLRs (Wilkins and Gale 2010). Cependant, certains travaux montrent que LGP2 agirait comme un régulateur positif des senseurs RIG-I et MDA5 (Satoh, Kato et al. 2010). En effet, ces différents senseurs ont en commun un domaine DExD/H-Box ARN hélicase permettant de reconnaître le ligand ARN et de transduire le signal pour activer la réponse IFN de type I, *via* une activité ATPasique. La perte de l'activité ATPase de ce domaine, abolit en revanche la mise en place de l'activité antivirale dépendante des voies RLRs dans un modèle murin transgénique. LGP2 pourrait également faciliter l'accessibilité des ARN viraux pour RIG-I et MDA5 pour induire une réponse IFN de type I optimale (Satoh, Kato et al. 2010).

- **DDX3**

Récemment, un nouveau membre appartenant à la famille des « DExD/H box RNA helicasés » a été identifié : **DDX3**. Ainsi, le senseur DDX3 pourrait interagir avec le ligand Poly(I:C) ou des ARN viraux au niveau cytosolique, et s'associer avec l'adaptateur MAVS pour activer la réponse IFN- $\beta$ . L'hypothèse actuelle est que DDX3 pourrait également interagir avec RIG-I et MDA5 pour former un complexe multiprotéique permettant une réponse IFN- $\beta$  plus robuste (Schroder 2011). D'autres études sont nécessaires pour déterminer si DDX3 est



un senseur à ARN *per se*, ou s'il joue le rôle d'adaptateur dans la voie de signalisation médiée par les RLRs.

### III.3.1.1.3 Les senseurs cytoplasmiques à ADN

La transfection d'ADN plasmidique ou l'infection par un virus à ADN d'une cellule immunitaire ou non, induit la production des cytokines IFN de type I indépendamment de l'activation de la voie TLR9 (Ishii and Akira 2006). Des études montrent également que la mise en place d'un état antiviral, dans une cellule stimulée par de l'ADN exogène, requiert le recrutement de TBK1 et IKKi (Takaoka, Wang et al. 2007). Ces données font dès lors supposer que des senseurs à ADN seraient présents au niveau cytosolique (figure 27).

- **DAI**

La protéine **DAI** a finalement été identifiée comme le premier senseur à ADN cytoplasmique. Elle pourrait ainsi reconnaître l'ADN de conformation Z et B au niveau intracellulaire. L'inhibition de son expression abolit la production d'IFN de type I en réponse à l'infection par le virus HSV-1. La réponse IFN au niveau des fibroblastes serait également dépendante de DAI dans le cas de l'infection par le virus HCMV. Cependant, l'inactivation de DAI, dans des modèles murins transgéniques, n'abolit pas complètement la réponse IFN de type I suivant une stimulation par un ligand synthétique ADN, suggérant ainsi la présence d'autres senseurs à ADN cytoplasmiques.

- **STING**

La protéine **STING** localisée au niveau du RE a également été identifiée comme étant capable d'activer la réponse IFN de type I suivant la stimulation par un ADN ou un ARN cytoplasmique, et ceci *via* l'interaction avec TBK1, Sec5 et DDX3 (Sun, Li et al. 2009). Il semblerait que STING ne puisse pas interagir directement avec le ligand ADN, suggérant ainsi une action en aval d'un autre senseur à ADN tel que DAI. Des souris déficientes pour STING seraient hautement susceptibles à l'infection par des virus à ADN (HSV), mais également par des virus à ARN (VSV), évoquant ainsi un rôle de STING dans l'activation de l'immunité innée contre différentes familles virales (Ishikawa, Ma et al. 2009).

- **ARN polymérase III**

La voie de signalisation médiée par les RLRs pourrait également être impliquée, de façon indirecte, dans la reconnaissance des ADN viraux. En effet, il a été démontré que l'**ARN polymérase III** cellulaire pouvait transcrire une séquence d'ADN riche en AT, en ARN 5'ppp qui pourrait *in fine* activer RIG-I et donc l'expression des IFN de type I. Ainsi, ce mécanisme

permettrait de détecter les ADN viraux des virus EBV et HSV-1, afin de mettre en place une réponse antivirale (Ablasser, Bauernfeind et al. 2009; Chiu, Macmillan et al. 2009).

- **LRRFIP1**

La protéine **LRRFIP1** serait également impliquée dans la détection des ADN viraux. En effet, son inhibition par des siRNA abolirait la réponse IFN suite à l'infection par le virus VSV. Par ailleurs, le « knockout » de cette protéine inhiberait l'activation de l'immunité innée après stimulation par les ligands Poly(I:C), Poly(dG:dC) et Poly(dA:dT), témoignant ainsi de l'implication de LRRFIP1 dans la reconnaissance des ADN de conformation Z et B, mais également de l'ARN double brins. Cette dualité de fonction serait, par ailleurs, indépendante de l'ARN polymérase III. De plus, LRRFIP1 ne régule pas le facteur IRF3 pour induire une réponse IFN, mais plutôt une protéine impliquée dans la voie  $\beta$ -caténine. En effet, LRRFIP1 possède la capacité de se lier à l'ARN et à l'ADN, et induit dès lors la phosphorylation de la protéine  $\beta$ -caténine, qui pourra transloquer dans le noyau et s'associer avec le complexe CBP/P300 afin d'induire l'expression du gène IFN- $\beta$  (Yang, An et al. 2010).

- **IFI16**

La protéine **IFI16**, appartenant à la famille des PyHIN, pourrait également jouer le rôle de senseur à ADN double brin. Cette famille protéique est représentée par 4 membres (IFI16, IFI16, MDA5 et AIM2) qui contiennent tous des domaines pyrines et HIN200, capables d'interagir avec des motifs ADN (Unterholzner and Bowie 2011). Plus particulièrement, il a été montré que l'inhibition (par Knockdown) du récepteur IFI16 diminuait la réponse IFN- $\beta$  induites par des ligands ADN double brins, alors que la réponse à l'infection par le virus ARN Sendai n'était pas modifiée. De plus, son inhibition par des siRNA réduirait l'activation des facteurs IRF3 et NF $\kappa$ B induite par l'infection HSV-1. Dans la plupart des types cellulaires, IFI16 est principalement retrouvé au niveau nucléaire, sauf dans les macrophages où il peut également être retrouvé au niveau cytosolique. Ainsi, la capsid du virus HSV-1, ubiquitinée et dégradée par le protéasome, pourrait être reconnu par IFI16 dans les macrophages au niveau cytosolique (Horan, Hansen et al. 2013).

- **DHX36 et DHX9**

Appartenant également à la famille des DExD/H box RNA helicases, **DHX36** et **DHX9** pourraient reconnaître les ADN CpG de type A et B, respectivement, dans les pDCs. Ainsi, la stimulation de DHX9 induirait la sécrétion d'IFN- $\alpha$ , *via* l'activation du facteur IRF7, alors que la stimulation de DHX36 induirait la sécrétion des cytokines TNF- $\alpha$  et IL-6, *via* l'activation du facteur NF $\kappa$ B. L'inhibition de ces senseurs ADN bloquerait ainsi la reconnaissance du virus HSV-1, alors que la réponse au virus ARN de type Influenza ne serait pas affectée.

Par ailleurs, certaines protéines de la famille des DExD/H box RNA helicases pourraient également être utilisées par les virus pour leur propre réplication. Ainsi, DHX9 pourrait augmenter la traduction des ARN viraux par liaison au niveau de la séquence 5'UTR dans le cas du virus HIV-1 (Bolinger, Sharma et al. 2010). DHX9 pourrait également être incorporé dans la nucléocapside par liaison avec la protéine gag et l'ARN de ce virus. La déplétion de DHX9 induirait dès lors une baisse de l'infectivité des virions sécrétés, ainsi qu'une diminution de la rétrotranscription des ARN du virus HIV-1 (Xing, Liang et al. 2011).

#### III.3.1.1.4 L'inflammasome

En plus d'induire l'activation des réponses proinflammatoires et IFN de type I, la détection d'acides nucléiques cytosoliques, par le complexe inflammasome, conduit également à la maturation des formes pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 en cytokines antivirales IL-1 $\beta$  et IL-18, respectivement, *via* la voie dépendante de la caspase 1 (Martinon, Mayor et al. 2009). La cytokine IL-1 $\beta$  a un rôle biologique proche de la cytokine TNF- $\alpha$ , et est impliquée dans l'activation des lymphocytes T et le recrutement des cellules immunitaires innées. La cytokine IL-18 augmente l'activité cytolytique des NKs ainsi que leur capacité sécrétrice d'IFN- $\gamma$ . Contrairement aux IFN de type I et à TNF- $\alpha$ , la production d'IL-1 $\beta$  est contrôlée au niveau de sa transcription, traduction, maturation et sécrétion. De nombreux stimuli, incluant des ligands des TLRs, activent la transcription des ARNm des formes pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18. Cependant, sans autres stimuli, ces pro-formes ne sont pas prises en charge par les vésicules d'exocytose, et restent ainsi séquestrées dans le cytoplasme. La maturation des formes pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 est dépendante de la caspase 1, elle-même présente sous forme de pro-enzyme, non active, dans les cellules à l'état basal. La maturation de la caspase 1 est contrôlée par le complexe inflammasome (figure 27).

- **NLRP1 à NLRP14**

Ce complexe multiprotéique de haut poids moléculaire peut être constitué de différents membres (**NLRP1 à NLRP14**), capables de reconnaître un signal spécifique d'activation, et de s'associer à l'adaptateur ASC. Ce dernier pourra interagir avec la pro-caspase 1 et induire sa maturation en enzyme active. La caspase 1 clivera ensuite les formes pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 en cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18, respectivement. Ainsi, des souris déficientes pour le senseur NLRP3 seraient particulièrement susceptibles aux infections par des virus à ARN. Dans le cas du virus Influenza, l'absence de NLRP3 serait associée à la diminution de la synthèse des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18, et du recrutement des cellules immunitaires innées au niveau des poumons, nécessaire au contrôle de l'infection. L'interaction directe entre l'inflammasome NLRP3 et les motifs ARN n'a pas pu être mise en évidence, et il semblerait de plus que, dans le cas du virus Influenza, la protéine M2 puisse jouer le rôle de PAMP. Par ailleurs, le complexe inflammasome NLRP3 pourrait participer à la

détection des virus à ADN tel l'adénovirus. Ainsi, des macrophages, issus de modèles murins déficients pour ce complexe inflammasome, ne pourraient pas sécréter la cytokine IL-1 $\beta$  en réponse à l'infection par l'adénovirus.

- **IFI16**

L'ADN KSHV épisomale pourrait également être reconnu par **IFI16** au niveau nucléaire qui pourrait ainsi former un complexe inflammasome en interagissant avec ASC, induisant la maturation des formes pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 (Singh, Kerur et al. 2013).

- **AIM2**

En plus de la famille des NLR, le senseur **AIM2**, partageant de fortes homologies de structure avec IFI16, serait également capable de reconnaître de l'ADN étranger au niveau cytoplasmique, et d'induire l'activation de la caspase 1. En effet, une fois activé, AIM2 pourrait s'oligomériser avec l'adaptateur ASC pour induire la voie de maturation des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18. L'inflammasome AIM2 jouerait ainsi un rôle important dans la détection des virus à ADN. Son activation serait cruciale dans le contrôle de l'infection par le MCMV par exemple. Par ailleurs, des travaux récents ont pu établir une corrélation entre le niveau d'activation de l'inflammasome AIM2 dans les PBMC, et l'établissement d'une infection chronique par HBV chez les patients. Ces résultats laissent ainsi supposer que l'inflammasome AIM2 pourrait être impliqué dans la clairance de l'infection HBV (Wu, Xu et al. 2013).

Les différents complexes inflammasomes sont ainsi capable d'induire une réponse antivirale dirigée contre un pathogène donné, mais peuvent également être inhibés par les virus. Ainsi, le virus KSHV aurait mis en place une stratégie d'évasion pour inhiber la réponse antivirale médiée par l'inflammasome. En effet, la protéine ORF63 de ce virus posséderait de fortes homologies de structure avec la famille des NLR, et pourrait ainsi interagir avec NLRP1 et NLRP3 pour inhiber l'assemblage de l'inflammasome (Gregory, Davis et al. 2011). Par ailleurs, les protéines NS1 du virus Influenza ainsi que les protéines SPI de certains poxvirus pourraient également bloquer l'activation de la caspase 1, inhibant dès lors la sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 (Lamkanfi and Dixit 2011).

CYTOPLASME

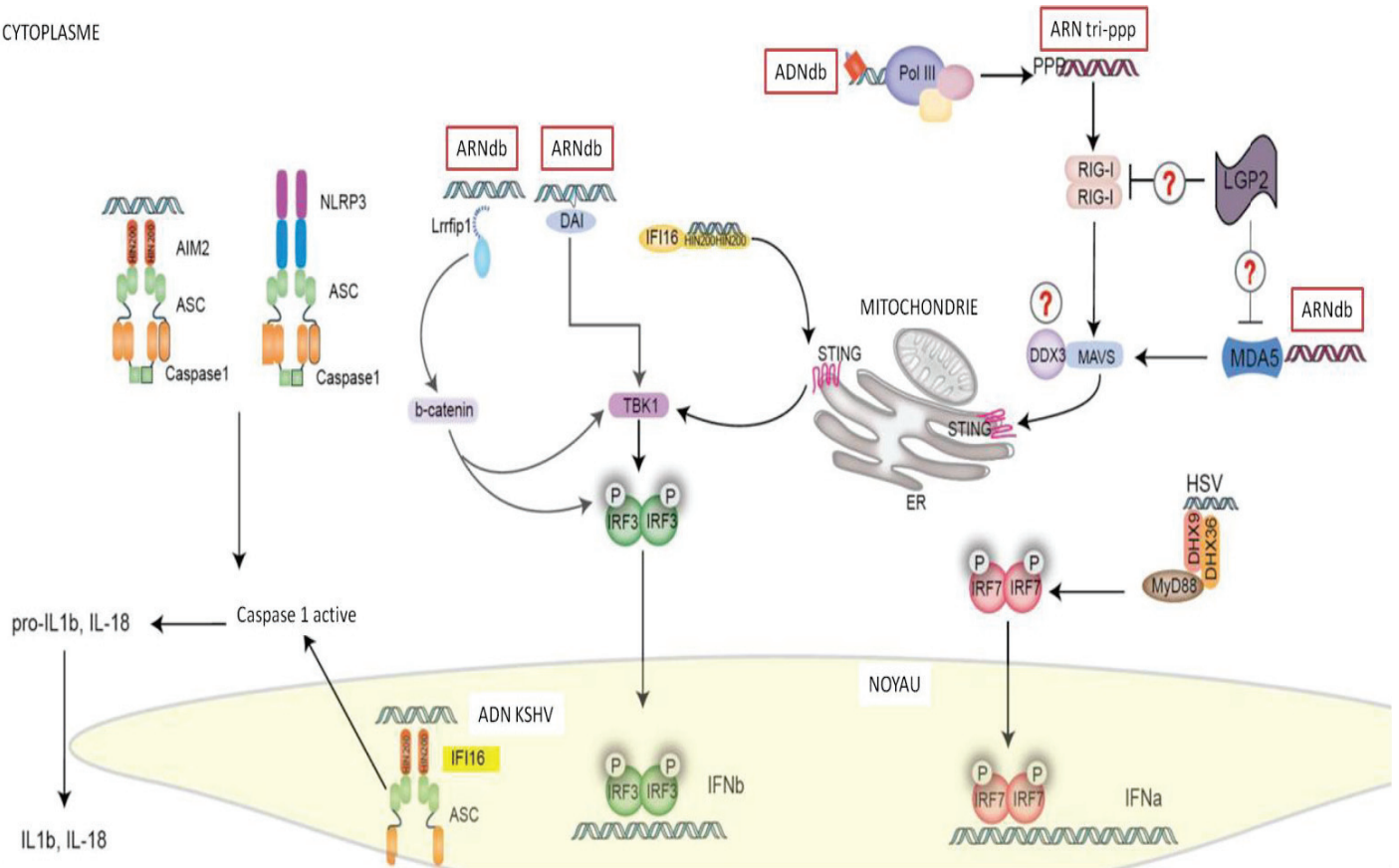


FIGURE 27 : LES SENSEURS CYTOPLASMIQUES ET NUCLEAIRES (ADAPTEE DE THOMPSON ET AL. 2011)

De nombreux senseurs, incluant IFI16, l'ARN polymérase III, DAI, LRRFIP1, DHX9/36, sont capables de reconnaître des motifs ADN et d'induire, en réponse, la sécrétion des cytokines IFN de type I et proinflammatoires. Les senseurs RIG-I et MDA5 reconnaissent les motifs ARN au niveau du cytosol. Les différents senseurs ADN et ARN convergent vers les adaptateurs STING ou MAVS, respectivement. STING et MAVS activeront les voies TBK1-IRF3 ou IKK $\beta$ -NF $\kappa$ B, qui permettront l'expression des IFN de type I ou des cytokines proinflammatoires, respectivement. AIM2 (se liant à l'ADN double brin) et NLRP3 (interagissant avec l'ARN viral) induisent la formation de l'inflammasome, au niveau cytoplasmique, comprenant les adaptateurs ASC et caspase 1. Au niveau nucléaire, IFI16 peut également détecter de l'ADN viral et induire l'activation de la protéine ASC, suivie de la protéine caspase 1 au niveau cytoplasmique. L'activation de la caspase 1 induit le clivage des formes pro-IL-1b et pro-IL-18 en IL-1b et IL-18, respectivement, qui pourront dès lors être sécrétées.

### **III.3.1.2 Les réponses Interférons**

Les réponses IFN sont l'une des premières lignes de défense de l'organisme, et ceci grâce à la détection précoce des pathogènes par les divers senseurs PRRs. La production d'IFN agit ainsi très précocement au cours de l'infection et diminue la permissivité des cellules avoisinantes au virus, et ainsi sa propagation.

#### **III.3.1.2.1 Les différents types d'IFN**

Il existe plusieurs sous types d'IFN classés en trois groupes : les IFN de type I, II et III :

- **Les IFN de type I**

Ils comprennent de nombreux sous types tels les IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\kappa$ , - $\omega$ , - $\delta$  et - $\epsilon$ . Les IFN de type I  $\alpha$  et  $\beta$  sont à l'heure actuelle les plus étudiés. En effet, les caractéristiques des autres sous types sont encore mal définies. Chez l'homme, il existe 13 gènes différents codant pour l'IFN- $\alpha$ , alors qu'un seul gène a été décrit pour l'IFN- $\beta$ . Cette famille de gène est regroupée au niveau du bras court du chromosome 9 (Samuel 2001). Les gènes codant pour l'IFN- $\alpha$  présentent 95% d'homologie entre eux et même si la nature multigénique de l'IFN- $\alpha$  est connue depuis longtemps, sa signification biologique est encore débattue. Il semblerait que les IFN- $\alpha$  et - $\beta$  puissent être produits par toutes les cellules nucléées de l'organisme, même si l'IFN- $\alpha$  est retrouvé principalement sécrété par les cellules hématopoïétiques alors que l'IFN- $\beta$  serait plutôt produit par les cellules épithéliales et les fibroblastes (Sommereyns, Paul et al. 2008).

Il a été montré que des souris transgéniques déficientes pour le récepteur aux IFN- $\alpha$  et - $\beta$  devenaient extrêmement sensibles aux infections virales. Cependant, peu d'information sont disponibles pour comprendre la diversité de fonction entre les IFN- $\alpha$  et - $\beta$ . Il a tout de même été observé que des souris déficientes pour le gène IFN- $\beta$  devenaient très sensibles au virus de la vaccine et que par conséquent, le système des IFN- $\alpha$  ne compensait pas cette déficience (Deonarain, Alcamì et al. 2000). En effet, les IFN- $\alpha$  ne peuvent pas être produits directement après une infection virale, et ceci contrairement à l'IFN- $\beta$ . Ainsi, la production d'IFN- $\alpha$  serait une conséquence de la production d'IFN- $\beta$ , et agirait ainsi comme une boucle d'amplification du signal pour contrôler l'infection dans les cellules avoisinantes. Les IFN- $\alpha$  et - $\beta$  agissent d'ailleurs sur le même récepteur hétérodimérique ubiquitaire appelé IFNRA1/IFNRA2, activant ainsi une voie de transduction du signal particulière appelée la voie Jak/Stat permettant l'expression de gènes antiviraux ISGs (pour « Interferon Stimulated Gene ») (Randall and Goodbourn 2008).

En plus de leur activité antivirale directe, les IFN de type I pourraient également participer à la régulation de la réponse adaptative (cf. partie «II.2.1.2 Les traitements à base

d'interféron »). Il a ainsi été montré que les IFN- $\alpha$  et - $\beta$  inhibaient l'apoptose des lymphocytes T, favorisaient la prolifération des lymphocytes T mémoires, et stimulaient l'activation des cellules NKs ainsi que la maturation des DCs. En outre, les IFN de type I pourraient également augmenter l'expression des molécules CMH de classe I et II (Randall and Goodbourn 2008).

- **Les IFN de type II**

Ils comprennent un seul membre appelé IFN- $\gamma$  codé par un gène unique présent sur le chromosome 12. Cette cytokine est exprimée par les cellules immunitaires innées, tels les NKs/NKTs ainsi que par les cellules immunitaires adaptatives, tels les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Elle possède un effet direct antiviral et anti-tumoral assez faible. En effet, l'IFN- $\gamma$  est plutôt impliqué dans le dialogue moléculaire entre les différentes catégories de cellules immunitaires innées et adaptatives qui possèdent le récepteur hétérodimérique IFNGR. Plus particulièrement, son activation induit l'expression des gènes CMH de classe I et II, la différenciation des monocytes en macrophages et la production d'espèces réactives de l'oxygène au sein des phagocytes pour lyser les pathogènes. L'IFN- $\gamma$  permet également de réguler les lymphocytes T en les orientant vers une réponse de type Th1, plutôt antiviral.

- **Les IFN de type III**

Ils comprennent différents membres appelé IFN- $\lambda$  1, 2 et 3 (ou IL-29, IL28-B et IL28-A respectivement) (Kotenko 2011). Ces gènes sont situés sur le chromosome 19 chez l'homme et contiennent 5 à 6 exons contrairement à l'exon unique des IFN de type I, même si ces deux familles présentent de fortes homologues de séquence. En outre, l'organisation génétique des IFN de type III est assez similaire à celle de la famille IL-10 impliquée dans la réponse proinflammatoire. De plus, ces deux familles partagent la même sous unité du récepteur IL-10R $\beta$  (Sheppard, Kindsvogel et al. 2003). Les IFN- $\lambda$  1, 2 et 3 pourraient ainsi être un lien évolutif entre les IFN- $\alpha$  et - $\beta$ , et la famille proinflammatoire IL-10.

La plupart des cellules de l'organisme peuvent exprimer les IFN de type III, mais contrairement à IL-10R $\beta$ , la deuxième sous-unité du récepteur nommé IL-28R $\alpha$  n'est pas exprimée de façon ubiquitaire (Meager, Visvalingam et al. 2005). Plus particulièrement, cette sous-unité n'est pas exprimée dans les cellules endothéliales alors qu'elle est retrouvée dans les cellules épithéliales (Sommereyns, Paul et al. 2008). Au niveau hépatique, IL-28R $\alpha$  est exprimé par les hépatocytes et dans les lignées d'hépatome HepG2 et HuH7 (Doyle, Schreckhise et al. 2006).

Les IFN- $\lambda$  sont induits de façon identique aux IFN de type I, c'est-à-dire après l'activation des voies de signalisation en aval des senseurs PRRs, et même s'ils ne partagent pas le même



récepteur, ils conduisent également à une réponse antivirale dans les cellules cibles *via* la voie Jak/Stat (Onoguchi, Yoneyama et al. 2007). A l'heure actuelle, aucune donnée n'a pour l'instant mis en évidence une action spécifique des IFN de type III par rapport aux IFN- $\alpha$  et - $\beta$ . Cependant, il semble admis que les IFN- $\lambda$  ne peuvent pas se substituer aux IFN de type I. En effet, des souris déficientes pour le récepteur IFNRA1/IFNRA2 deviennent très sensibles aux infections virales, alors que la réciproque n'est pas vérifiée (Ank, Iversen et al. 2008). Ceci pourrait s'expliquer, du moins partiellement, par le caractère non-ubiquitaire du récepteur IL-28R $\alpha$ , à l'inverse du récepteur IFNRA1/IFNRA2. Cependant, chez des patients asthmatiques, une corrélation a été établie entre le défaut de production des IFN de type III et la sévérité d'une infection par un rhinovirus (Contoli, Message et al. 2006).

### III.3.1.2.2 La régulation de l'expression des IFN de type I

Le contrôle majeur de l'expression des IFN de type I a lieu au niveau transcriptionnel. En l'absence de stimulation des PRRs, leur expression basale est *quasi* indétectable. En effet, la conformation compactée de la chromatine ainsi que la présence de répresseurs transcriptionnels au niveau des gènes IFN permettent d'inhiber leur expression (Ford and Thanos 2010). Différents répresseurs transcriptionnels ont ainsi été identifiés comme par exemple IRF2 (Taniguchi, Ogasawara et al. 2001). Le facteur inhibiteur IRF2 interagit avec une séquence de régulation positive au niveau des promoteurs des gènes IFN- $\alpha$  et - $\beta$ .

Après activation des voies de signalisation médiées par certains PRRs, les facteurs IRF3 et IRF7 phosphorylés au niveau de plusieurs résidus sérines se dimérisent et exposent leur séquence NLS pour transloquer dans le noyau (Dragan, Hargreaves et al. 2007). Enfin, ils entrent en compétition avec IRF2 au niveau de son site de fixation sur les promoteurs et jouent ainsi le rôle de facteur activateur de transcription. Dans les cellules épithéliales, le facteur IRF3 exprimé constitutivement est plutôt associé à une réponse précoce, et ceci contrairement au facteur IRF7 induit lors d'une infection virale et donc impliqué dans un rétrocontrôle positif de cette voie. A l'inverse, dans les pDCs, le facteur IRF7 exprimé constitutivement permet une réponse IFN rapide, suite à la détection d'un pathogène. Dans certains types cellulaires, les protéines IRF1 et IRF5 peuvent également activer l'expression des gènes IFN (Paun and Pitha 2007). Par ailleurs, en plus du déplacement du facteur IRF2 lors d'une stimulation par un ligand ou d'une infection virale, il semblerait que la protéine IRF2 soit également dégradée.

D'autres facteurs de transcription, n'appartenant pas à la famille des IRF, sont également impliqués dans l'activation transcriptionnelle des gènes IFN. En effet, à l'état basal, le complexe NF $\kappa$ B est retenu au niveau cytoplasmique par son inhibiteur I $\kappa$ B. Certains stimuli induisent la phosphorylation du facteur I $\kappa$ B et par conséquent sa dégradation par le protéasome permettant la translocation du facteur NF $\kappa$ B dans le noyau et son interaction avec le promoteur IFN- $\beta$ . Finalement, l'hétérodimère AP1/cJun est également impliqué dans

le contrôle de l'expression du gène IFN- $\beta$ . Contrairement à IRF3 et NF $\kappa$ B, ce complexe est préférentiellement localisé au niveau nucléaire et peut dès lors interagir avec l'ADN dans les cellules non stimulées/non infectées. Cependant, sans stimulus préalable induisant la phosphorylation de son domaine actif *via* la signalisation des MAP kinases, le complexe AP1/cJun ne peut pas induire l'expression des gènes IFN.

Le promoteur IFN- $\beta$  est constitué de 50 bp situées dans la région -104 à -55 bp en amont du +1 de transcription (Munshi, Yie et al. 1999). Il contient quatre séquences de régulation positive au niveau de son promoteur (PRD I à PRD IV) occupées par les différents complexes de facteurs de transcription. Les facteurs IRF3 et IRF7 se lient au niveau de la région PRD I et PRD III, le complexe AP1 (ATF2/cJun) se lie au niveau de la région PRD IV, et le complexe NF $\kappa$ B se lie au niveau de la région PRD II. Ainsi, l'expression du gène IFN- $\beta$  nécessite une interaction coordonnée dans l'espace et dans le temps entre ces divers facteurs et son promoteur. Le premier acteur impliqué dans cette activation est le facteur NF $\kappa$ B, limitant car retrouvé en faible quantité. Il est tout d'abord recruté au niveau de séquences Alu, puis interagit avec le promoteur IFN- $\beta$  *via* des interactions inter-chromosomiques. Cette liaison est ensuite suivie du recrutement d'AP1/cJun et d'IRF3. La coopération entre ces différents facteurs forme ainsi un complexe appelé « enhanceosome ». Une fois assemblé, ce complexe interagit avec les protéines PCAF/GCN5 qui permettent l'acétylation des histones associées au nucléosome adjacent. Dès lors, le cofacteur CBP/p300 ainsi que l'ARN polymérase II sont recrutés pour induire *in fine* la transcription des IFN de type I (Apostolou and Thanos 2008; Ford and Thanos 2010) (figure 28).

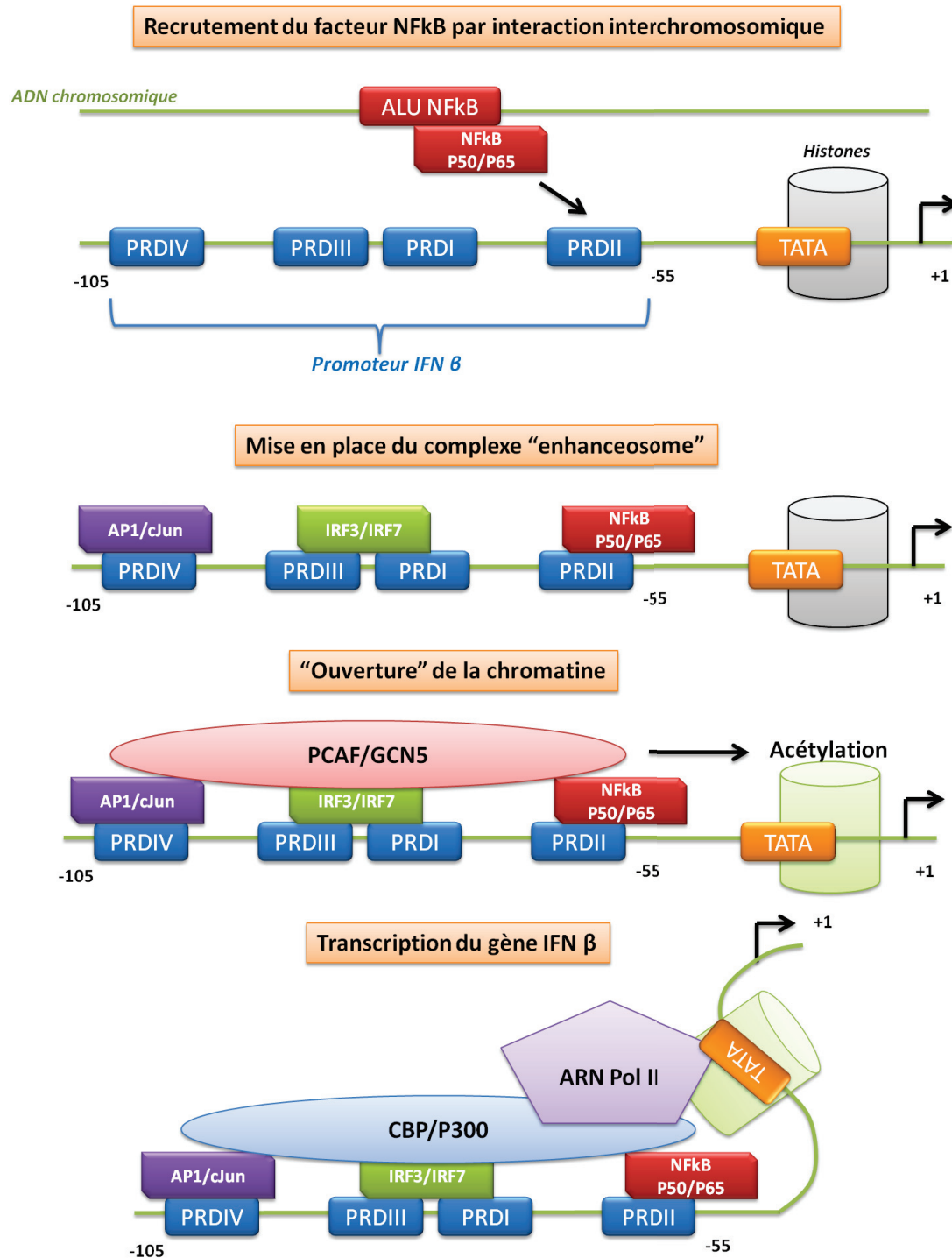


FIGURE 28 : MECANISME D'ACTIVATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GENE IFN-B

Via les interactions chromosomiques, le facteur NFκB, situé sur les régions Alu contenant des sites pour sa propre fixation, est délivré au niveau du domaine PRDII du promoteur IFN-β. De façon coopérative, les complexes AP1/cJun et IRF3/IRF7 interagissent avec leur site de liaison sur le promoteur IFN-B, pour former l'enhanceosome avec NFκB. Le complexe PCAF/GCN5 est dès lors recruté pour acétyler les histones H3 et H4, afin de rendre accessible la chromatine au complexe CBP/p300-ARN polymérase II qui initiera la transcription du gène IFN-B.

### III.3.1.2.3 La réponse antivirale

Une fois sécrétés, les IFN de type I et III peuvent activer de manière autocrine et/ou paracrine la voie de signalisation Jak/Stat *via* la fixation sur leur propre récepteur hétérodimérique, IFNRA1/IFNRA2 (IFNRA) et IL28B $\alpha$ /IL10R $\beta$  (IFNRL) respectivement. Les récepteurs IFNRA et IFNRL sont associés à des tyrosines kinases Jak1 et Tyk2 au niveau de leur domaine intracellulaire. Ces protéines, activées après interaction entre une molécule d'interféron et son propre récepteur, induisent la phosphorylation des facteurs de transcription STAT1 et STAT2. Ces deux facteurs forment ainsi un complexe multimérique avec le facteur de transcription IRF9. Ce complexe appelé ISGF3 est ensuite transloqué dans le noyau pour activer l'expression des ISGs *via* le motif ISRE contenu dans leur promoteur (figure 29).

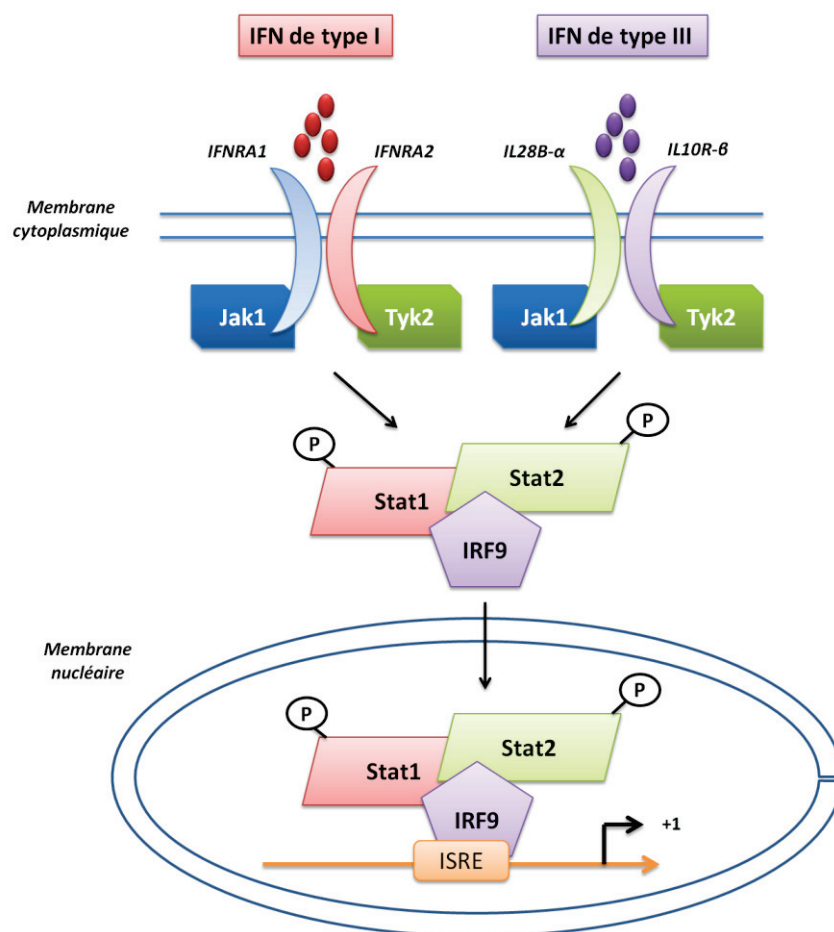


FIGURE 29 : LA VOIE DE SIGNALISATION JAK/STAT

La fixation des IFN de type I et III sur leur propre récepteur hétérodimérique induit l'activation des kinases Jak1 et Tyk2, qui phosphoryleront le complexe ISGF3 (Stat1-Stat2-IRF9). Ce complexe transloquera dans le noyau, interagira avec les séquences ISRE pour induire les ISGs.

Parmi les protéines induites par la voie IFN de type I ou III (ISGs), certaines peuvent avoir une action directe sur divers étapes de la réplication virale telles les protéines OAS1, PKR, MxA, ISG56, APOBEC, vipérine, tétherine...

La **protéine OAS1**, induite par l'interféron, est synthétisée sous forme inactive et peut être activée après stimulation par de l'ARN double brin. Elle catalyse la synthèse d'un oligo-adénylate ppp(A2'p)<sub>n</sub>A, ou 2-5A, contenant des liaisons phosphodiester. Cet oligo-adénylate peut ensuite activer la RNase L qui digérera ainsi les ARN viraux pour inhiber la réplication (Samuel 2001).

La **protéine PKR** est synthétisée sous forme inactive et peut être également activée en réponse à un ARN double brins. En outre, elle peut répondre à un stress cellulaire appelé PACT (Patel, Handy et al. 2000). La protéine PKR est une sérine/thréonine kinase qui se dimérise et s'auto-phosphoryle pour devenir active. Elle inhibe la traduction en phosphorylant eIF2 $\alpha$ , sous unité  $\alpha$  du facteur 2 d'initiation de la traduction, ce qui permet son interaction avec eIF2 $\beta$ . En effet, une fois séquestré, le facteur eIF2 $\beta$  ne permet plus l'échange entre le GDP et le GTP sur eIF2 ce qui inhibe l'initiation de la traduction (Samuel 2001).

La **protéine ISG56** peut également inhiber l'initiation de la traduction en interagissant avec le complexe eIF3. En effet, cette interaction déstabilise le complexe de transfert eIF2-GTP-tRNAi<sup>Met</sup> ce qui bloque les processus de traduction coiffe-dépendante. A l'inverse, la synthèse protéique initiée par un IRES n'est pas perturbée (Randall and Goodbourn 2008).

La **protéine MxA** possède également une action antivirale efficace. En effet, elle agirait au niveau des nucléocapsides viraux en les séquestrant. Il a ainsi été montré que MxA sédimentait avec la nucléocapside du virus Thogoto *in vitro* et de par cette interaction, la nucléocapside serait alors incapable d'être transportée et de transloquer dans le noyau pour poursuivre son cycle de réplication (Haller and Kochs 2002). MxA et OAS1 pourraient également être responsables de l'inhibition de la réplication du virus HBV observée après stimulation par IL-17 en cellules HepG2.2.15 (Wang, Zhao et al. 2013).

Les **protéines APOBEC** sont des désaminases de cytidines possédant une activité virale contre un large spectre de rétrovirus. Parmi ces protéines, on peut citer APOBEC3F et APOBEC3G. Leur mode d'action implique, en plus des mutations de la matrice virale par déamination, une inhibition de la transcription inverse. Ces protéines peuvent être encapsidées dans les virions néoformés et ainsi être transférées dans les cellules nouvellement infectées. Il existe un mécanisme d'échappement viral mis en place par la protéine Vif du HIV qui, par ubiquitination, induit la dégradation des protéines APOBEC *via* le protéasome (Goila-Gaur and Strebel 2008).

La **protéine vipérine** possède également une activité antivirale en perturbant la formation des radeaux lipidiques, structures importantes impliquées dans la réplication et le bourgeonnement de certains virus. Ainsi, en interagissant avec la FDS (pour « Famesyl Diphosphatase Synthase »), elle pourrait par exemple perturber le bourgeonnement du virus influenza (Wang, Hinson et al. 2007). Récemment, il a été montré qu'elle pouvait également être impliquée dans le contrôle de l'infection par le virus chikungunya (Teng, Foo et al. 2012).

La **protéine tétherine** (ou BST-2) possède un large spectre d'action antivirale en perturbant également le bourgeonnement viral (Sauter, Specht et al. 2010). Elle serait ainsi capable d'inhiber la propagation des virus de la famille des rétrovirus, arénavirus, flavivirus (HCV), herpesvirus, orthomyxovirus (influenza A) et filovirus (Swiecki, Omattage et al. 2013). Parallèlement, diverses stratégies d'évasion auraient été développées par les virus à son encontre pour échapper à son action antivirale. On peut par exemple citer la protéine Vpu du virus HIV-1 qui pourrait interagir avec la tétherine et induire sa dégradation par le protéasome *via* son ubiquitination (Vigan and Neil 2010).

En plus de leur action antivirale directe, certains ISGs peuvent également induire un état pro-apoptotique dans les cellules infectées pour favoriser l'élimination virale. Plus particulièrement, les protéines OAS et PKR peuvent être impliquées dans des phénomènes liés à l'apoptose. De plus, parmi les ISGs induits par les interférons se trouvent des gènes de pro-caspases et finalement, P53, un gène pro-apoptotique, pouvant également être induit sous l'effet de l'interféron (Lee, Kim et al. 2009).

### **III.3.2 L'interaction entre HBV et le système immunitaire innée**

#### **III.3.2.1 HBV : un virus invisible pour le système immunitaire inné ?**

A l'heure actuelle, le rôle de l'immunité innée dans le contrôle de l'infection HBV est encore peu décrit, et ceci contrairement à l'implication de la réponse adaptative dans la restriction virale (Bertoletti and Ferrari 2012). Ainsi, son rôle est toujours controversé du fait de la difficulté d'identifier, d'analyser et de recruter des patients diagnostiqués dans les phases précoces d'infection (réplication lente, virémie faible, absence de symptômes...), et les limites expérimentales imposées par les modèles *in vitro* et *in vivo* pour l'étude du virus HBV (cf. partie « les modèles d'étude du HBV »).

Le virus HBV a longtemps été considéré comme un faible activateur de la réponse innée dans les phases aiguës d'infection. Contrairement aux personnes infectées par les virus HCV et HIV, les patients infectés par HBV sécrètent faiblement et tardivement de cytokines proinflammatoires IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-15, IL-10 et IL-6, durant les phases précoces d'infection (Stacey, Norris et al. 2009). De plus, aucune activation de la réponse IFN de type I n'a pu être mise en évidence lors de la phase d'expansion logarithmique du virus chez les patients (Dunn, Peppas et al. 2009). Ces observations cliniques ont pu être confirmées dans les modèles animaux marmottes et chimpanzés où, malgré une réplication active du virus, l'activation de la réponse innée pendant les premières semaines d'infection n'a pu être clairement détectée (Wieland and Chisari 2005; Fletcher, Chin et al. 2012).

Cependant, des études semblent montrer que certains PAMPs du virus HBV pourraient bien être reconnus par le système des PRRs (Durantel and Zoulim 2009). Ainsi, des données du laboratoire ont pu montrer que la réplication virale, induite par une transduction baculovirale délivrant le génome HBV dans les cellules HepaRG, permettait l'activation de la réponse IFN- $\beta$ , et ainsi la mise en place d'un état antiviral responsable de la clairance de l'infection (Lucifora, Durantel et al. 2010). Les mécanismes impliqués dans la détection du virus HBV et l'implication de la réponse innée dans le contrôle de l'infection sont, à l'heure actuelle, toujours inconnus. En effet, aucune donnée n'a encore pu identifier les PAMPs HBV, les PRRs, la signalisation engagée, ainsi que les ISGs impliqués dans la résolution de l'infection. Le virus HBV est un virus ADN utilisant une matrice ADN nucléaire (ADNccc), qui code en abondance l'ARNpg utilisé pour l'étape de rétrotranscription au niveau cytoplasmique. Ainsi, de nombreux senseurs cytoplasmiques à ADN/ARN et nucléaire pourraient être impliqués dans la détection du virus HBV dans les hépatocytes (cf. partie « Le système de détection des pathogènes médié par les PRRs »).

Par ailleurs, *in vitro*, les cellules de Kupffer, au sein d'une culture d'hépatocytes primaires humains, pourraient également détecter HBV et induire, dès lors, une réponse proinflammatoire associée à la sécrétion des cytokines IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Hosel, Quasdorff et al. 2009). De façon intéressante, dans cette étude, l'activation de la réponse innée n'aura été que transitoire, et pourrait ainsi être le reflet d'une inhibition active médiée par HBV.

Les cellules NKs ont également un rôle clé dans le système immunitaire innée, et peuvent être activées soit, *via* les cytokines IFN de type I, IL-12 et IL-18, présentes dans le microenvironnement lors d'une infection, soit *via* la présence ou l'absence de récepteurs activateurs et inhibiteurs, respectivement, en surface des cellules infectées. Les hépatocytes expriment un taux faible de molécules CMH de classe I (Gehring, Sun et al. 2007). Ainsi, un stress cellulaire induit par la détection du virus HBV pourrait aisément induire une augmentation de ces molécules et activer les NKs, même en l'absence d'une réponse mesurable de la voie IFN de type I. Ainsi, dans le modèle chimpanzé infecté par HBV, la



clairance virale associée à une réponse adaptative efficace, serait précédée d'un pic de sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , cytokines pouvant être sécrétées par les NKs, au niveau intrahépatique (Guidotti, Rochford et al. 1999). Dans le modèle de la marmotte, l'activation des NKs et NKTs, au niveau intrahépatique, a également pu être observée à des stades précoces (48h p.i.), suivant l'infection par des doses importantes de virus HBV (Guy, Mulrooney-Cousins et al. 2008). De façon intéressante, dans cette étude, l'activation précoce de l'immunité innée aura été corrélée avec la diminution de la réplication virale, mais de façon transitoire seulement, suggérant un mécanisme d'évasion actif du virus HBV. D'autres études ont montré que l'activation des NKs dans les stades précoces de l'infection HBV n'exerçait pas d'effet antiviral direct, mais d'avantage une action de coordination, avec la sécrétion des cytokines IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , pour mettre en place une réponse immunitaire adaptative efficace pour éliminer l'infection (Yang, Althage et al. 2010).

Ces données suggèrent finalement que le virus HBV pourrait être détecté par les hépatocytes, mais aussi par les cellules immunitaires innées hépatiques telles que les KCs et les NKs/NKTs. De plus, de nombreuses études tendent à démontrer que le virus HBV aurait mis en place des mécanismes d'inhibition actifs de la réponse innée, ce qui pourrait expliquer que son activation est souvent retrouvée faible et/ou transitoire (Guy, Mulrooney-Cousins et al. 2008; Hosel, Quasdorff et al. 2009). En effet, *via* ses protéines virales, le virus HBV pourrait contrecarrer, *in fine*, l'activation de la réponse antivirale qui pourrait être mise en place suite à la détection de ces PAMPs.

### ***III.3.2.2 HBV : un virus particulièrement efficace pour inhiber les réponses immunes de l'hôte***

De nombreuses études tendent ainsi à montrer que les différentes protéines virales pourraient être particulièrement efficaces pour inhiber activement la réponse innée au niveau hépatique et systémique.

#### **III.3.2.2.1 Inhibition de la réponse IFN dans les hépatocytes**

Les hépatocytes sont les seules cellules de l'organisme à pouvoir supporter un cycle complet de réplication, et pourraient dès lors être capable, en théorie, de détecter tous les PAMPs générés par la réplication virale (acides nucléiques et protéines). De nombreuses études ont ainsi mis en évidence que, pour se protéger d'une telle détection, le virus HBV aurait mis en place des stratégies d'évasion active, *via* ses protéines virales.

Ainsi, la polymérase virale pourrait affecter la voie IFN de type I induite par TLR3 et RIG-I en interagissant avec IRF3, dans un modèle de surexpression en cellules d'hépatomes (Wang and Ryu 2010; Yu, Chen et al. 2010). Plus particulièrement, elle interagirait avec

DDX3, un activateur transcriptionnel du gène IFN- $\beta$ , pour contrecarrer l'activation des voies médiées par ces senseurs à ARN double brins. Par ailleurs, la protéine HBx pourrait également contrecarrer les voies de signalisation médiée par les RLRs. Dans un modèle de surexpression en cellules d'hépatome, il a ainsi été démontré que HBx était capable de bloquer l'expression du gène IFN- $\beta$  en inhibant MAVS, un adaptateur de la voie de signalisation médiée par RIG-I (Wang, Li et al. 2010). En outre, la protéine HBx pourrait agir comme une enzyme de dé-ubiquitination sur RIG-I, TRAF3, IRF3 et IKKi pour également aboutir à la répression de la voie IFN de type I (Jiang and Tang 2010). Dans les années 1990, il a de plus été démontré que la protéine de capsid était responsable de l'inhibition de l'expression du gène IFN- $\beta$  en cellules d'hépatome (Twu, Lee et al. 1988; Whitten, Quets et al. 1991). Ces résultats obtenus dans des modèles de surexpression, au sein de cellules d'hépatome, nécessitent bien sûr d'être confirmés dans des modèles d'infection plus pertinent, en utilisant des quantités de protéines virales plus physiologiques.

En plus de contrecarrer l'expression du gène IFN- $\beta$  dans les hépatocytes, le virus HBV pourrait également inhiber l'effet antiviral médiée par la réponse IFN, en ciblant la voie JAK/STAT en aval du récepteur IFNAR1/2 et, *in fine*, l'activation des ISGs. Tout d'abord, des données cliniques montrent une résistance aux traitements à base d'IFN- $\alpha$  pégylé chez 70% des patients porteurs chroniques. Plus particulièrement, en cellules d'hépatome et à partir de biopsies, il a ainsi été montré que, par surexpression du facteur PP2A, les antigènes HBs et/ou HBx inhibaient la signalisation IFN- $\alpha$  et l'expression des ISG (Christen, Duong et al. 2007). En effet, la surexpression de PP2A inhiberait PRMT1, enzyme responsable de la méthylation de STAT1. De plus, la polymérase inhiberait également la translocation nucléaire du facteur de transcription STAT1, et ainsi la réponse antivirale médiée par la cytokine IFN- $\alpha$  (Wu, Xu et al. 2007). Les protéines Core/PréCore pourraient finalement diminuer l'expression de l'ISG MxA, induit par l'IFN- $\alpha$ , et ceci *via* l'interaction au niveau de la séquence ISRE de son promoteur (Rosmorduc, Sirma et al. 1999; Fernandez, Quiroga et al. 2003).

### III.3.2.2.2 Inhibition des fonctions des cellules immunitaires innées

Divers composants viraux sont également sécrétés en abondance dans le sérum des patients infectés par HBV : les particules infectieuses, l'AgHBs et l'AgHBe. Ainsi, le virus HBV pourrait également agir au niveau des cellules immunitaires innées résidentes et systémiques pour induire un état d'immunotolérance au niveau hépatique.

Ainsi, l'AgHBs, l'AgHBe et les particules virales pourraient contrecarrer l'activation des voies TLRs, en inhibant l'activation des facteurs IRF3, NFkB, ERK1/2, et en bloquant *in fine* l'expression du gène IFN- $\beta$  et des ISGs dans les hépatocytes, mais aussi dans les KCs et les LSECs (Wu, Meng et al. 2009). Par ailleurs, il semblerait que l'AgHBe inhibe également l'expression du récepteur TLR2 en surface, dans les PBMC et les hépatocytes (Visvanathan,

Skinner et al. 2007). De plus, le niveau d'expression de TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6 est retrouvé diminué dans les PBMC issues de patients chroniquement infectés, et par conséquent la sécrétion des cytokines IL-6, IL-8, IL-12 et TNF- $\alpha$  en réponse à une stimulation par un ligand TLR est également inhibée, et ceci de façon proportionnelle au taux sérique d'AgHBs (Chen, Cheng et al. 2008).

Par ailleurs, même si des données ont montré que les cellules NKs pouvaient être activées pendant les phases précoces d'infection aiguë, il semblerait toutefois que leur capacité effectrice/sécrétrice soit altérée lors de l'augmentation de la virémie. De même, chez les porteurs chroniques HBV, le phénotype et la fonction des NKs peuvent également être modifiés. En effet, même si leur capacité cytotoxique est maintenue, il semble que leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  soit inhibée par le virus HBV, ce qui faciliterait la persistance virale. De plus, les thérapies antivirales, diminuant le taux de particules infectieuses circulantes, permettraient de restaurer partiellement l'activation de NKs et leur capacité à produire de l'IFN- $\gamma$ .

Plusieurs mécanismes peuvent être responsables du dysfonctionnement des cellules NKs lors de l'infection HBV. Ainsi, dans des modèles murins transgéniques AgHBs-positifs, le nombre de NKs, leur activation ainsi que leur pouvoir cytotoxique sont diminués, ce qui pourrait traduire l'effet immunosuppresseur de l'AgHBs (Chen, Wei et al. 2005). L'infection HBV bloquerait, en effet, l'activation des NKs en augmentant l'expression des récepteurs inhibiteurs tels NKG2A, TIM3, et en diminuant l'expression des récepteurs activateurs tels CD16 et NKp30 (Ju, Hou et al. 2010). Par conséquent, l'inhibition de NKG2A permettrait de restaurer les fonctions des NKs et de résoudre l'infection dans un modèle murin transgénique (Li, Wei et al. 2012). Par ailleurs, chez des patients infectés chroniquement, l'augmentation de la sécrétion d'IL-10, induite par HBV, pourrait également bloquer leur activation contribuant ainsi à la persistance de l'infection (Tripp, Wolf et al. 1993) (Tjwa, van Oord et al. 2011). Plus particulièrement, *via* la présence de la cytokine IL-10, la fonction des cellules NKs et leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$  pourraient être altérées (Dunn, Peppas et al. 2009; Peppas, Micco et al. 2010)(Dunn, Peppas et al. 2009), et par conséquent, l'inhibition de l'expression de cette cytokine immunosuppressive permettrait de restaurer leur fonctionnalité (Peppas, Micco et al. 2010).

Par ailleurs, la cytokine IL-10, retrouvée en grande quantité chez les porteurs chroniques du HBV, pourrait également inhiber les pDCs, en bloquant leur capacité à sécréter de l'IFN- $\alpha$  et en induisant leur apoptose. En effet, lors d'une infection HBV, la fonction et le phénotype des pDCs sont altérés chez les patients (Woltman, Op den Brouw et al. 2011). Par ailleurs, leur nombre dans le sang semble inversement corrélé à la charge virale, et une thérapie anti-HBV (Lamivudine) pourrait restaurer le pool de pDCs circulants, ce qui témoigne, dès lors, de l'effet immunosuppresseur médié par HBV sur les cellules dendritiques (Zheng, Zhang et al. 2007).

Plus particulièrement, HBV pourrait bloquer la phosphorylation d'IRF7 médiée par l'activation de la voie TLR9, et par conséquent inhiber la production des cytokines IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IP10 et IL-6 (Woltman, Op den Brouw et al. 2011). Par ailleurs, l'AgHBs pourrait contrer la signalisation TLR9, en interagissant avec le récepteur BDCA2 et en bloquant la translocation nucléaire d'IRF7, à travers l'induction de SOCS1, un régulateur négatif des voies TLRs (Xu, Hu et al. 2009). Il semblerait également que l'expression basale de TLR9 soit diminuée dans les PBMC, inhibant par conséquent la production d'IFN- $\alpha$  chez les patients porteurs chroniques (Vincent, Zannetti et al. 2011).

En plus de l'inhibition directe de la fonctionnalité des cellules immunitaires innées, HBV pourrait également perturber leur relation avec les pDCs. Plus particulièrement, le dialogue entre les NKs et les pDCs est crucial pour la mise en place d'une réponse immunitaire efficace contre un pathogène donné (Della Chiesa, Romagnani et al. 2006). Il a ainsi été montré que le virus HBV inhibait les fonctions des cellules NKs induites par les pDCs. En effet, l'activité et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les NKs, médiée par les pDCs, sont retrouvées significativement diminuées chez les patients chroniquement infectés (Martinet, Dufeu-Duchesne et al. 2012; Shi, Tjwa et al. 2012).

Le devenir de l'infection HBV serait ainsi dépendant, en partie, de la mise en place précoce de l'immunité innée. D'autres études approfondies sur l'inhibition des réponses immunes par HBV sont donc nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'échappement immunitaire précoce, et ainsi identifier les facteurs viraux/cellulaires impliqués dans le passage à la chronicité. En effet, reverser la tolérance immunitaire rencontrée chez les patients porteurs chroniques du HBV, en stimulant les réponses innées anti-HBV, pourrait être une stratégie immuno-thérapeutique prometteuse.



# **OBJECTIFS DES TRAVAUX DE** **RECHERCHE**

Malgré l'existence d'un vaccin prophylactique efficace, l'infection chronique par le virus de l'hépatite B demeure un réel problème de santé publique mondiale avec 240 millions de porteurs chroniques ayant un risque accru de développer de graves complications hépatiques. Les traitements actuels à base d'IFN ou d'analogues de nucléosides ne permettent pas d'éradiquer complètement l'infection du fait de la persistance de l'ADNccc et de la résistance observée chez de nombreux patients.

Le virus de l'hépatite B n'étant pas cytopathique, l'immunopathogénèse de l'infection HBV résulte principalement d'une réponse immunitaire inefficace et délétère de l'hôte. L'histoire naturelle du CHB se divise généralement en quatre phases, identifiées par le taux sérique des marqueurs biochimiques (ALAT) et sérologiques (AgHBs, AgHBe et ADN HBV) des patients : l'immunotolérance, la rupture naturelle de la tolérance, l'inactivation et l'échappement immunitaire. Plus particulièrement, la phase d'immunotolérance est caractérisée par une forte réplication du virus qui ne donne lieu à aucune réponse immunitaire détectable, pouvant se prolonger sur plusieurs décennies, et qui peut ainsi faciliter l'installation d'une infection chronique. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes impliqués dans cette phase d'immunosuppression afin de développer de nouvelles stratégies visant à « réveiller » le système immunitaire et induire une rupture de tolérance thérapeutique suivie d'une inactivation efficace du virus pour combattre l'infection.

La première ligne de défense d'un organisme face à une infection virale est l'activation de la réponse innée *via* la détection des motifs microbiens (PAMPs) par les senseurs de l'immunité innée (PRRs). Les PRRs regroupent différentes classes de senseurs selon leur spécificité de reconnaissance (protéines virales, acides nucléiques ou séquences CpG non méthylées) et de leur localisation (membranaire, cytosolique, endosomale). Leur activation entraîne une cascade des voies de signalisations intracellulaires (adaptateurs, kinases et autres facteurs de transcriptions) qui conduisent à la synthèse et la sécrétion de plusieurs cytokines/chimiokines notamment des interférons de type I (IFN- $\alpha/\beta$ ) et III (IFN $\lambda$ 1/2/3 ou IL-28A/IL-28B/IL-29) et des cytokines proinflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ...).

La réponse antivirale est d'autre part amplifiée lorsque les IFNs activent à leur tour de manière autocrine et paracrine, leurs propres récepteurs hétérodimériques (IFNRA1/IFNRA2 ou IFN $\lambda$ R1/IL10R2) et la voie de signalisation JAK/STAT qui conduisent, *in fine*, à l'expression de nombreux gènes (ISGs) codant notamment pour des protéines qui

auront une action antivirale (Mx-A, OAS, PKR, APOBEC ...). En plus de l'activation précoce de ces voies suite à l'infection, la sécrétion de chimiokines inflammatoires permet également le recrutement et l'activation de cellules immunitaires spécialisées de l'immunité innée (DCs, NKs et NKTs) indispensables à la mise en place, *in fine*, de l'immunité adaptative pour permettre un contrôle optimal de la propagation virale au sein de l'organisme (Kumar, Kawai et al. 2011).

Même si de nombreuses infections peuvent ainsi être neutralisées par ce système de reconnaissance, il est aujourd'hui clairement admis que certains virus, dont le virus HBV, ont développé des stratégies d'échappement efficaces pour réussir à persister dans l'organisme (Ait-Goughoulte, Lucifora et al. 2010; Bertoletti and Ferrari 2012). De ce fait, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires d'inhibition de la réponse innée permettrait de développer de nouvelles stratégies immunothérapeutiques pour réactiver le système immunitaire en dormance au niveau de la cellule infectée et de son microenvironnement.

Cependant, lors de la première phase de l'infection, l'étude de la réponse innée cellulaire précoce a pour principale difficulté l'identification et le recrutement des patients en phase aigüe d'infection, les manifestations cliniques associées à l'infection par HBV ne débutant que plusieurs semaines après l'infection au cours de la phase d'expansion logarithmique. L'ADN viral et les marqueurs sériques (AgHBs et AgHBe) ne pouvant être mesurés de façon précoce du fait de la lente cinétique de réplication du virus, plusieurs études ont émis l'hypothèse que le virus n'était pas détecté par l'organisme et resterait « invisible » vis-à-vis des systèmes de reconnaissances cellulaires de l'hôte. De plus, dans les étapes précoces d'infection, malgré le taux de réplication virale élevé, il semblerait que le virus n'induisse qu'une faible production systémique des cytokines IFN- $\alpha$ , IL-15, IL-6 et TNF- $\alpha$  contrairement aux fortes décharges cytokiniques observées dans le cas d'autres virus tels que les virus HIV et HCV (Wieland, Thimme et al. 2004; Fletcher, Chin et al. 2013).

L'absence d'activation du système immunitaire durant les phases précoces d'infection pourrait en partie être la résultante de la stratégie de réplication virale, où le génome HBV est constamment contenu dans la capside virale et ainsi protégé des senseurs PRRs. En effet, l'encapsidation précoce de l'ARNpg néosynthétisé ne permettrait pas à la cellule infectée de « voir » l'ADN ou l'ARN viral au cours du cycle de réplication du virus dans le cytoplasme. Par ailleurs, la production précoce de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 pourrait aussi expliquer l'absence d'activation cellulaire et l'échappement précoce à l'immunité innée cellulaire (Peppia, Micco et al. 2010).

D'autre part, il semblerait que le virus ait développé des stratégies très efficaces pour inhiber ou contourner cette réponse innée cellulaire visant à empêcher sa détection et/ou la mise en place d'une réponse antivirale efficace. Ce dernier point est illustré par le fait que les traitements en clinique à base d'IFN exogène sont peu efficaces contre l'infection HBV



(70% des patients sont non-répondeurs), suggérant ainsi que le virus serait capable de contrecarrer la voie de signalisation des IFN de type I. Dans la littérature, les données *in vitro* montrent que les protéines du virus HBV sont capables d'interférer avec les voies de signalisation cellulaire de la réponse innée. Parmi celles-ci, la polymérase virale serait capable d'inhiber l'activité des IRFs et la translocation nucléaire de STAT1, afin de bloquer l'activation transcriptionnelle de certains ISGs (Wang and Ryu 2010). La protéine HBx pourrait également bloquer l'import nucléaire de STAT1 et interagir avec le facteur IPS1 pour bloquer l'activation de la voie IFN de type I médiée par RIG-I de façon similaire aux virus HCV et HAV qui ciblent la même voie (Kumar, Jung et al. 2011). Ces quelques exemples montrent, qu'au delà d'une simple absence de réponse immunitaire médiée par une non-reconnaissance des PAMPs viraux dans la phase d'immunotolérance, il semblerait que le virus HBV puisse activement inhiber la mise en place d'un état antiviral en réprimant les réponses innées cellulaires (Ait-Goughoulte, Lucifora et al. 2010; Bertoletti and Ferrari 2012).

Jusqu'à présent, il était difficile de vérifier ces données *in vitro* dans une infection dite « naturelle » par le virus de l'hépatite B. En effet, l'étude du virus HBV a longtemps souffert du manque de modèles de culture cellulaires pertinents immunocompétents et présentant un cycle complet de réplication. Seuls les hépatocytes primaires humains (PHH) étaient permissifs à l'infection par le virus de l'hépatite B *in vitro*, mais restaient cependant difficiles d'accès. Hosel *et al.* avait néanmoins observé que le virus HBV pouvait induire, de façon précoce et transitoire, une réponse inflammatoire de type IL-6 dans une culture d'hépatocytes primaires contenant une faible « contamination » en cellules de Kupffer (KCs), suggérant finalement que l'activation transitoire des KCs était impliquée dans la sécrétion d'IL-6 (Hosel, Quasdorff et al. 2009).

Cependant, la plupart des études portant sur la réponse innée des hépatocytes, en réponse au virus HBV, ont surtout été réalisées en cellules d'hépatome (Huh7, HepG2...), souvent invalidées dans de nombreuses voies de signalisation de l'immunité innée, y compris dans les réponses interférons et inflammatoires (Alexopoulos, Saez-Rodriguez et al. 2010). De par la non-permissivité de ces lignées transformées, ces études nécessitent également la vectorisation du génome HBV et ne prennent donc pas en compte toutes les étapes du cycle de réplication.

Afin d'étudier les interactions précoces entre le virus et la réponse immune des hépatocytes dans un processus naturelle d'infection par le virus HBV, la lignée HepaRG, décrite par Gripon *et al.*, et co-développée au laboratoire, représente aujourd'hui un outil unique pour l'étude de la biologie du virus (Gripon, Rumin et al. 2002), et est considérée comme une bonne alternative aux hépatocytes primaires humains. La lignée immortalisée HepaRG est une lignée « pure » hépatocytaire non transformée, pouvant être infectée par HBV, et présentant un cycle complet de réplication virale (Hantz, Parent et al. 2009). De plus, nous avons pu observer que ces cellules étaient capables de développer rapidement une

réponse antivirale efficace aboutissant à la clairance de l'infection (*via* l'activation de la voie IFN de type I) après transduction du génome HBV par un baculovirus recombinant (bac-HBV), qui permet une forte réplication du virus HBV dans cette lignée (Lucifora, Durantel et al. 2010).

Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de recherche ont porté sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la reconnaissance précoce du virus HBV par les hépatocytes, et dans le contrôle de la réponse antivirale dès lors induite, avec *in fine* l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans cette inhibition. En effet, la compréhension des relations précoces hôte/HBV est crucial pour développer de nouvelles approches immunothérapeutiques, pouvant exacerber la réponse immune cellulaire et contrôler, *in fine*, l'infection HBV.

L'objectif de la première étude (**Expression and Functionality of Pathogen Recognition Receptors in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells**) était d'effectuer une caractérisation complète de l'expression et de la fonctionnalité des senseurs de l'immunité innée dans le modèle cellulaire HepaRG, en comparaison avec les PHH. En effet, la démonstration de l'immunocompétence des cellules HepaRG et de leur proximité phénotypique avec les PHH était indispensable pour pouvoir substituer ce modèle aux cellules d'hépatome, dans l'étude précoce des relations hôte/virus, et en particulier pour analyser par la suite les mécanismes d'interaction entre le virus et l'immunité innée hépatocytaire. Dans cette étude, le niveau d'expression des TLRs et des RLRs, appartenant à la famille des PRRs, a été comparé dans les cellules HepaRG et les PHH à l'état basal. En parallèle, nous avons également analysé dans les cellules HepaRG, stimulées par chacun des ligands prototypiques des PRRs, leur réponse fonctionnelle, *via* l'expression de différents gènes de l'immunité innée et la sécrétion des cytokines IFN de type I et IL-6.

L'objectif de la deuxième étude (**Early Inhibition of the Hepatocyte innate responses by Hepatitis B Virus facilitates Establishment of a Persistent Infection**) était de mettre en évidence la modulation précoce de l'immunité innée hépatocytaire dans un réel contexte d'infection aiguë *in vitro*, *via* l'infection des cellules HepaRG ou des PHH. Le but était de comprendre comment le virus pouvait établir, de façon très précoce, une activation et/ou une suppression active de la réponse innée des hépatocytes infectés. Pour se faire, nous avons utilisé deux modèles virologiques mimant soit la clairance virale, faisant suite à une forte réponse IFN et inflammatoire (*via* la transduction des cellules avec le bac-HBV), soit la persistance virale (*via* l'infection naturelle par le virus HBV), aboutissant à une réponse abortive de l'immunité innée dans les cellules HepaRG. Par ailleurs, en purifiant les divers composants de l'inoculum HBV (particules infectieuses, AgHBs et AgHBe), nous avons finalement pu identifier les déterminants viraux responsables de l'inhibition précoce de la réponse inflammatoire (IL-6), de la réponse interféron (type I et III) et des ISGs (OAS1),

pouvant, dès lors, faciliter la persistance de l'infection virale dans notre modèle expérimental *in vitro*.

L'objectif de la troisième étude (**Virion-associated Hepatitis B core (HBc) protein is a very early negative regulator of the IFN response**) était finalement de déterminer quelle(s) étai(en)t plus spécifiquement la/les protéine(s) virale(s) responsable(s) de l'inhibition précoce de la réponse interféron dans les hépatocytes infectés, et d'en identifier les mécanismes moléculaires d'inhibition. Pour se faire, nous avons ainsi analysé les modifications transcriptionnelles et épigénétiques du génome de l'hôte associées à l'expression de cette protéine virale dans les cellules HepaRG et les PHH infectées par HBV.

Nos résultats ont ainsi permis de démontrer:

- ✓ Dans la première étude, que contrairement aux cellules d'hépatome, la lignée HepaRG exprime un profil d'expression des senseurs PRRs similaires aux hépatocytes primaires humains. Par ailleurs, suivant la stimulation par leur propre ligand prototypique, les PRRs sont capables d'activer une cascade de signalisation permettant la sécrétion des cytokines IFN de type I/III et proinflammatoires dans le surnageant des cellules, et *in fine* la mise en place d'un programme antiviral. Ceci suggère que la lignée immunocompétente HepaRG pourrait représenter un modèle pertinent pour étudier les interactions HBV/immunité innée, et développer des stratégies immunothérapeutiques anti-HBV basées sur l'utilisation d'agonistes de PRRs.
- ✓ D'autre part, nous avons montré dans la deuxième étude que le virus de l'hépatite B était capable d'induire une réponse innée hépatocytaire faible, transitoire et abortive, aboutissant à la persistance virale dans notre modèle expérimentale d'infection. En effet, nous avons pu mettre en évidence que le virus HBV était capable de désarmer rapidement et spécifiquement la réponse antivirale induite par l'activation des senseurs à ARN double brins (TLR3, RIGI/MDA5) pour établir son infection, *via* l'action immunomodulatrice de la particule infectieuse elle-même, de l'AgHBs et de l'AgHBe. De façon intéressante, nous avons pu montrer que seule la particule infectieuse était capable d'inhiber spécifiquement la réponse IFN.
- ✓ Dans la troisième étude, nous avons pu mettre en évidence que la protéine de capside (HBc) était le déterminant viral spécifiquement impliqué dans le contrôle de la réponse IFN de type I et III, à des temps très précoces suivant l'infection. Nous avons également pu déterminer le mécanisme moléculaire d'inhibition associé, à savoir l'interaction avec les promoteurs des gènes de l'immunité innée, et la modification du statut épigénétique des histones qui leur sont associées. L'AgHBc pourrait ainsi être un déterminant viral majeur impliqué dans la phase d'immunotolérance et dans la persistance de l'infection, en contribuant à l'échappement viral et à l'immunosuppression.



# Etude 1

## Expression and Functionality of Pathogen Recognition Receptors in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells

(Soumis)

Malika Ait-Goughoulte<sup>\*</sup>, Souphalone Luangsay<sup>\*</sup>, Maud Michelet,  
**Marion Gruffaz**, Michel Rivoire, Simon Fletcher, Hassan Javanbakht, David  
Durantel<sup>¶</sup> and Fabien Zoulim<sup>¶</sup>

*<sup>\*</sup>contributed equally, <sup>¶</sup>contributed equally*



## Expression and Functionality of Pathogen Recognition Receptors in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells

Malika Ait-Goughoulte<sup>1,2,\*</sup>, Souphalone Luangsay<sup>1,2,\*</sup>, Maud Michelet<sup>1,2</sup>, Marion Gruffaz<sup>1,2</sup>, Michel Rivoire<sup>3,4</sup>, Simon Fletcher<sup>5</sup>, Hassan Javanbakht<sup>5</sup>, David Durantel<sup>1,2,¶</sup> and Fabien Zoulim<sup>1,2,6,7,¶</sup>

1. INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie (CRCL), Lyon, 69008, France
2. Université de Lyon, UMR\_S1052, CRCL, 69008 Lyon, France
3. Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, 69008, France
4. INSERM U1032, 69003 Lyon, France
5. Hoffmann-La Roche Inc, Nutley, NJ 07110, USA
6. Hospices Civils de Lyon (HCL), 69002 Lyon, France
7. Institut Universitaire de France (IUF), 75005 Paris, France

### Contacts:

fabien.zoulim@inserm.fr

david.durantel@inserm.fr

Phone: + 33 4 72 68 19 70

Fax : +33 4 72 68 19 71

### Additional Footnotes:

\*contributed equally, ¶contributed equally, §corresponding authors

### Acknowledgements :

The authors would like to thank Lydie Lefrançois and Judith Fresquet for the isolation of primary human hepatocytes, as well as the staff from Pr Michel Rivoire's surgery room for providing us with liver resection. This work was supported by grants from ANRS (French national agency for research on AIDS and viral hepatitis; several grants from CSS4), FINOVI (Foundation for innovation in infectiology; project call n°4), FRM (Foundation for medical research; DEQ20110421327), Hoffmann-La-Roche (U.S.A. division) and by INSERM core grants. This work was also supported by the DEVweCAN LABEX (ANR-10-LABX-0061) of the "Université de Lyon", within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR).



## **Abstract**

### ***Background & Aims***

Beside primary human hepatocytes (PHH), HepaRG cells may represent a unique tool to investigate host-pathogen interactions, as they are non-transformed, differentiable into hepatocytes, human liver bipotent progenitors. To better understand how innate responses are activated in HepaRG, we analyzed, and compared to PHH, the expression and functionality of pattern recognition receptors (PRRs).

### ***Methods***

The expression levels of various toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors (RLRs) and NOD-like-receptors (NLRs) were compared in cells stimulated with prototypic PRR ligands. The functional response was analyzed by IL-6 and type-I interferon (IFN) secretion upon stimulation with PRR agonists and the expression of various innate immunity genes.

### ***Results***

The expression of virtually all PRRs was phenotypically similar in HepaRG and PHH. High levels of IL-6 were observed after activation of most PRRs, whereas IFN were measured only after stimulation of RIG-I/MDA5. Their mRNA level was also induced, with a particular pronounced elevation of RIG-I and MDA5. The induction of signaling pathway components, pro-inflammatory cytokines, type I/III IFN and interferon-stimulated genes were also observed following PRRs activation.

### ***Conclusions***

These results indicate that both PHH and HepaRG cells express a similar pattern of functional PRRs, thus qualifying HepaRG cells as a good model of “immunocompetent” cells to study hepatocyte/pathogen interactions.

## 1 Introduction

2 The liver is targeted by several important human pathogens, including plasmodium  
3 causing malaria in humans or viruses (32). Among those viruses, Hepatitis A virus  
4 (HAV) and Hepatitis E virus (HEV) do not establish chronic infections whereas  
5 Hepatitis B (HBV), Hepatitis D (HDV) and Hepatitis C viruses (HCV) may evolve  
6 toward chronicity (32). The high number of chronic carriers, around 240 million for  
7 HBV (WHO data) and 130 million for HCV worldwide, account for the rapid increase  
8 in the incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) (30). Pathogenesis of HBV and  
9 HCV infections, and the severity of virus induced liver injury are mainly determined  
10 by immunologically-mediated events rather than the virus itself, since only limited  
11 cytopathic effects are noticed in hepatocytes following infection (12).

12 The infection of cells by microorganisms leads to the activation of the host  
13 inflammatory defense response through the initial sensing of pathogen mediated by  
14 innate pattern recognition receptors (PRRs) (34). PRRs are mainly represented by  
15 Toll-like receptors (TLRs), C-type lectin receptors (CLRs), RIG-I-like receptors  
16 (RLRs) and NOD-like receptors (NLRs). In addition, intracellular DNA sensors are  
17 proposed as new types of PRRs. To date, ten functional TLRs have been identified in  
18 human (TLR1-10) and detect specific pathogen-associated molecular patterns  
19 (PAMPs) derived from viruses, bacteria, mycobacteria, fungi and parasites. These  
20 include lipoproteins recognized by TLR1, TLR2, and TLR6, double-stranded RNA  
21 (dsRNA) by TLR3, lipopolysaccharide (LPS) by TLR4, flagellin by TLR5, single-  
22 stranded RNA (ssRNA) by TLR7 and TLR8, and unmethylated-DNA containing CpG  
23 by TLR9 (2). Upon recognition of respective PAMPs, TLRs located either at the cell  
24 surface or in the endosomal compartment recruit distinct sets of adaptor molecules  
25 which initiate downstream signaling events that lead to the secretion of inflammatory  
26 cytokines, type-I IFN, chemokines and antimicrobial peptides (16). *In vitro* models  
27 have shown that an increasing number of viruses can activate TLR pathways (6).  
28 Cells also express cytoplasmic RNA helicases such as retinoic acid-inducible gene I  
29 (RIG-I) and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA-5) that function as an  
30 alternative class of PRRs through the recognition of dsRNA produced during virus  
31 replication.

32 There is a body of evidence that viruses can escape or evade IFN response and  
33 recent studies have increased our understanding of the underlying molecular

1 mechanisms of inhibitions (1). It is now clear that, following infection, viruses can  
2 induce complex intracellular events that affect many components of host signaling  
3 pathways to its own benefits (5, 13). Elucidating the strategies that are used by  
4 viruses to inhibit and to manipulate host responses is important for the understanding  
5 of the mechanism(s) by which viruses can establish persistent infections and to  
6 design strategies to unlock this inhibition in order to restore endogenous immune  
7 functions against viruses.

8 Although the expression of PRR genes was observed in human liver tissue and  
9 PHH, the presence and functional activity of the full spectrum of PRRs on human  
10 hepatocytes remains poorly defined (23, 28). Transformed hepatic cell lines such as  
11 HepG2 and Huh7 are commonly used to study hepatotropic viruses life cycle and  
12 early host/virus interaction in terms of innate immunity, however these hepatoma cell  
13 lines differ from PHH in that they do not have fully functional IFN pathways (17, 27)  
14 and display profound defect in PRRs signaling (3). Only freshly prepared primary  
15 human hepatocytes and the hepatocyte-like HepaRG cells can support a complete  
16 HBV and HDV life cycle, including the early events of infection (9, 10, 29) . HepaRG  
17 cells are bipotent liver progenitor cells that differentiate into both cholangiocyte-like  
18 and hepatocyte-like cells in culture. Throughout differentiation, HepaRG cells evolve  
19 from a homogeneous dedifferentiated, depolarized epithelial phenotype showing no  
20 specific organization to a structurally well-defined and polarized monolayer closely  
21 resembling those formed in PHH in culture (8, 18, 37). This cell line represents to  
22 date the only *in vitro* human model for hepatocytic differentiation and was shown to  
23 be functional for IFN signaling (25), making these cells a more relevant model to  
24 study hepatotropic viruses-induced innate immune response. However, the  
25 expression profile and the functionality of PRRs in this cell line have not been  
26 described so far. The demonstration of the functionality of PRR signaling pathways in  
27 HepaRG is required to fully promote this cell line as an alternative model to PHH for  
28 the study of the early host/pathogen interaction in terms of hepatocyte innate immune  
29 response. In this study, we have characterized the expression of PRRs in  
30 differentiated HepaRG (dHepaRG) and PHH and their functionality in dHepaRG.

## Material and Methods

### Cell culture and reagents

HepaRG cells were maintained in culture (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in William's medium (Invitrogen) supplemented with 10% Fetal bovine serum HyClone FetalClone II (FCII; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), penicillin/streptomycin 50 U/mL (Invitrogen), glutaMax (Invitrogen) 2 mM, insulin bovine 5 µg/mL, and 5x10<sup>-5</sup> M hydrocortisone hemisuccinate (Laboratories SERB, Paris, France). To differentiate HepaRG cells, cells were maintained without splitting for 2 weeks in standard medium, then for at least 2 more weeks in medium supplemented with 1.8% dimethylsulfoxide (cell culture grade, Sigma). HepaRG cells were cultured in parallel with epidermal growth factor (EGF) from the beginning of the cell culture (10 ng/mL; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). HepaRG cells present a CT genotype polymorphism upstream of *interleukin (IL)-28B* gene. Several studies reported that the CC genotype single nucleotide polymorphism predicts a spontaneous resolution of HCV infection and outcome of treatment among HCV genotype 1 infected patients (33). Primary human hepatocytes (PHHs) were freshly prepared from surgical liver resections as previously described (21).

### Stimulation of HepaRG cells

To investigate HepaRG cell response to stimulation with PRR ligands, differentiated cells (5x10<sup>5</sup> per well) were stimulated for 2, 8, 16 or 24h. At the indicated times, culture medium and cells were harvested for analysis.

Pam-3-Cys (P3C) a synthetic tripalmitoylated lipopeptide mimics the acylated amino terminus of bacterial lipoproteins for TLR1/2, freeze-dried heat-killed preparation of *Listeria monocytogenes* (HKLM) for TLR2, poly(I:C) a synthetic analog of double-stranded RNA for TLR3, Lipopolysaccharide LPS for TLR4, the component of the outer wall of Gram-negative bacteria, flagellin for TLR5, FSL-1 a synthetic lipoprotein that represents the N-terminal part of the 44-kDa lipoprotein LP44 of *Mycoplasma salivarium* for TLR2/6, Imiquinod is an imidazoquinoline amine analogue to guanosine for TLR7, ssRNA40 a 20-mer phosphothioate protected single-stranded RNA oligonucleotide containing a GU-rich sequence coupled to cationic lipid Lyovec for TLR7 and 8, CpG ODN a synthetic oligonucleotides containing unmethylated CpG dinucleotides in particular sequence contexts that induce strong immunostimulatory effects through the activation of TLR9 (CpG DNA type A and B), poly(I:C)-Lyovec are

preformed complexes between poly(I:C) and the transfection reagent LyoVec which induce the activation of the RIG-I/MDA-5 signaling pathway (RIGI-MDA5). All ligands were purchased from Invivogen/Cayla. Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) was purchased from PBL Interferon Source (Tebu).

### **Quantitative PCR (RT-qPCR)**

Total RNA was extracted from cells with the NucleoSpin RNA II kit according to manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). RNA reverse transcription was performed using the Superscript® III RT (Life Technologies). Gene expression was analyzed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) with the Express SYBR GreenER™ qPCR SuperMix Universal (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). mRNA expression level was determined using the comparative cycle threshold (Ct) method, where the amount of target DNA was normalized to housekeeping genes RPLP0 and  $\beta$ -actin cDNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ). When cells were stimulated with ligands the amount of target DNA was normalized to housekeeping genes and to the unstimulated control cDNA. Primers used for the qPCR step are presented in **Table 1**.

### **Flow cytometry analysis**

To detect cell surface as well as intracellular TLR expression,  $10^6$  HepaRG or PHH cells were fixed with paraformaldehyde (2%) and permeabilized with saponin (0.25%). After saturation (saponin 0.25%, FBS 3%), cells were stained with purified anti-human TLR2, 4, 5, 6 (Santa Cruz, CA, USA) and anti-human TLR3, 7, 8 and 9 (Alexis Biochemicals) followed by incubation with the appropriate secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Cells were analyzed using a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences). Data of 10,000 events each were acquired and analyzed using CellQuestPro software (BD Biosciences).

### **Western blot analysis**

Cells were harvested in lysis buffer (140 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100), 0.05% sodium dodecyl sulfate, 1× protease inhibitor cocktail, Roche). Clarified lysates were subjected to SDS-PAGE (10%) and Western blot transfer to nitrocellulose membranes (Millipore). Membranes were probed with anti-RIG-I or anti-MDA5 antibodies (Alexis) followed by peroxidase-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) and detection by enhanced

chemiluminescence (Pierce). For protein normalization, the blots were stripped and reprobed with primary antibody to actin (Sigma).

### ***Enzyme-linked immunoassay for IL-6***

HepaRG and PHHs were exposed to various PRRs ligands. TLR1/2 (P3C, 500-50-5ng/mL), TLR2 (HKLM,  $10^8$  cells/mL,  $10^7$  cells/mL,  $10^6$  cells/mL, TLR3 (Poly I:C, 1-0.1-0.01  $\mu$ g/mL ) TLR4 (LPS, 1-0.1-0.01 ng/mL ), TLR5 (Flagellin, 50-5-0.5 ng/mL), TLR6 (FSL1, 5-1-0.2 ng/mL), TLR7 (Imiquinod, 10-1-0.1  $\mu$ g/mL) TLR8 (ssRNA40, 10-2-0.4  $\mu$ g/mL), TLR9 (CpG, 5-1-0.2  $\mu$ M) RIGI/MDA5 (Poly I:C-Iyovec, 1-0.2-0.04  $\mu$ g/mL). After 12h of incubation, the conditioned medium was harvested and assayed for IL-6 cytokine by ELISA using the human IL-6 assay kit according to the manufacturer's protocol (Invitrogen).

### ***Analysis of Secreted Type I Interferon***

Two millions of Huh7.5 cells were transfected with 10  $\mu$ g pISRE-Luc vector (Stratagene) in a 10 cm diameter dish using Mirus TransIT-LT1 transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Mirus Bio LLC). The pISRE-Luc plasmid (plasmid containing the luciferase gene under the control of the Interferon Stimulated Response Element) expresses luciferase under type-I IFN inducible promoter. After a 16h incubation with transfection mixture cells were trypsinized and reseeded in a 96-well plate at approximately  $3 \cdot 10^4$  cells/well in a volume of 50  $\mu$ L. Six hours later, 50  $\mu$ L of collected HepaRG supernatants previously stimulated by PRR ligands TLR9 (CpG ODN type A and type B at 10 to 100  $\mu$ M), TLR4 (LPS at 100 ng to 1  $\mu$ g/mL), TLR7/8 (ssRNA40 at 1,10, or 50 ng/ml), TLR7 (Imiquinod at 1, 10, 100 ng/ml), TLR3 (poly I:C at 0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml), RIGI-MDA5 (Iyovec-poly I:C at 0.2, 2  $\mu$ g/ml), were added to the wells. After 24h at 37°C, cells were washed with phosphate-buffered saline and lysed before luciferase activity was monitored using the Renilla Luciferase Assay System (Promega).

## Results

### ***Analysis of PRRs expression in HepaRG cells and PHH at the mRNA level***

Differentiated HepaRG cells and PHHs were investigated for mRNA expression levels for TLR1 to TLR10 and for other genes, which are essential in TLR signaling or known to have antiviral activities. TLR1, 2, 3, 4, 5, 6 and 9 were expressed at similar levels in both HepaRG and PHHs. In PHHs, RIG-I and MDA5 were slightly more expressed than TLRs, while in HepaRG their expression level was similar. TLR7 and TLR10 were weakly expressed in both cell types. Interestingly, the expression of TLR8, which can recognize single strand RNA viruses (similarly to TLR7), was found to be the most elevated in both cell types (**Fig. 1A**).

The expression level of these PRRs was further analyzed according to the HepaRG differentiation status. Indeed, to assess whether cholangiocyte-like cells and hepatocyte-like cells express similar levels of PRRs mRNA, HepaRG cells were cultured in presence or in absence of epidermal growth factor (EGF). EGF increases the commitment of cells toward the hepatocyte-like phenotype, leading to around 70-80% of hepatocytes as compared to 30-50% obtained in differentiation procedure without EGF (**Fig. 1B**). An increase, up to two fold, of TLR2, 4, 6 and 10 upon EGF treatment could be observed suggesting a higher expression of these PRRs in hepatocyte-like cells.

### ***Analysis of PRRs expression in HepaRG cells and PHHs at the protein level***

TLR protein expression in HepaRG and PHH was further analyzed by flow cytometry and western-blot (**Fig. 2**). FACS analysis showed that all TLRs (TLR2-9) were present in HepaRG cells and PHH (**Fig. 2A**), including TLR7, which expression at mRNA level was very low. The expression of TLRs in differentiated HepaRG cells seems to be slightly higher than in PHH notably for TLR3, whereas the mRNA levels were similar suggesting differences in post-transcriptional or post-translational regulations. The expression of the cytosolic sensors RIG-I and MDA5 was analyzed by western-blot in PHHs and differentiated HepaRG cells. At the basal level, the two proteins were barely detectable, whereas upon a 24h stimulation with IFN- $\alpha$  (1000 UI/ml), a strong induction of these sensors was observed in both cell types. The increase in TLR expression at protein level in HepaRG cells upon short term IFN- $\alpha$  treatment was barely detectable by FACS analysis (less than 10% of increased signal; **data not shown**).



1 Altogether, these results showed that dHepaRG cells have a similar pattern of  
2 basal expression of innate immunity sensors as compared to PHH. For the rest of the  
3 study, we then focused on the characterization of the functionality of those receptors  
4 only in dHepaRG cells.

### 5 ***Inducibility of PRRs and cytokine mRNA expression upon stimulation with*** 6 ***PRRs prototypic ligands***

7 Differentiated HepaRG cells were stimulated for 2, 4, 8 and 16h by PRRs cognate  
8 ligands (**Fig. 3**). After cell stimulation, an increased in the accumulation of mRNA  
9 was observed for all PRRs, except for TLR6 and TLR9. The strongest induction could  
10 be detected for RIGI and MDA5, with a maximal induction of 50 and 30 fold  
11 respectively reached after 24h of stimulation. TLR4 stimulated by LPS reached a 2-  
12 fold induction after 24h, whereas TLR1, 2, 3, 5, 7 and 8 stimulated by P3C, HKLM,  
13 poly(I:C), flagellin, imiquinod and ssRNA40 respectively increased between 2 to 5-  
14 fold. The stimulation of PRRs by cognate ligands could also induce the expression of  
15 the pro-inflammatory cytokine gene (IL-6), the type I and type III IFNs (IFN $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\lambda$ )  
16 and interferon stimulated genes, ISGs (ISG56). With the exception of TLR7 and 9  
17 ligands, all cognate ligands could induce IL-6 gene expression (**Fig. 3**). PRR  
18 stimulation (TLR2, 3, 4, 5, 6, RIG-I/MDA5) by cognate ligands could induce IL-6  
19 expression up to 100 fold after 16h of stimulation, whereas a 100-fold induction was  
20 observed for TLR8 after 2h of stimulation only. Interestingly, a study on Huh7 cells  
21 reported the induction of IL-6 mRNA after stimulation of TLR2 only, whereas no  
22 induction of IL-6 could be detected at all in HepG2 cells (31). Because production of  
23 type-I interferons, in particular IFN- $\beta$ , is one of the first cellular antiviral defenses, we  
24 first tested whether the gene was activated at mRNA level in HepaRG cells after  
25 PRR stimulation, and indeed interferon- $\beta$  gene expression was found induced after  
26 stimulation by PRR cognate ligands. IFN- $\beta$  gene increased 2 to 4-fold after  
27 stimulation with TLR3, 4, 7, 8 and 9 ligands. The strongest induction was observed  
28 following stimulation with RIGI-MDA5 ligands, which reached a 700-fold induction  
29 after 24h. Stimulation of TLR3, 7, 9 and RIG-MDA5 also induced IFN- $\alpha$  expression  
30 from 1.5 for TLR9 to 4-6 fold for TLR7 and RIGI-MDA5 stimulations respectively.  
31 Type III IFN (IFN- $\lambda$ ) expression has been shown to depend on the same stimulations,  
32 i.e. viral infection or TLR ligands, and signal transduction pathway, as those inducing  
33 type I IFN expression (4). IFN- $\lambda$  transcripts (IL-28B and IL-29) were also strongly

1 induced (up to 30-fold) following TLR3 and TLR4 stimulation. The strongest induction  
2 was again detected for RIGI-MDA5 ligands (up to 80-fold), but was delayed when  
3 compared to the TLR stimulation. No induction of IL-28B transcript was detected after  
4 stimulation of TLR7, 8 and 9. However, a 2-fold induction of IL-29 transcripts was  
5 detected after stimulation with TLR7 and 8 ligands. The activation of IFN transcripts  
6 was associated to the activation of ISGs such as ISG56 induced after TLR3  
7 stimulation (up to 60-fold) and RIGI-MDA5 (up to 80-fold). These results show that all  
8 TLRs are functional as their stimulation triggers the induction of either IL6 gene  
9 and/or type I and/or III IFNs.

10 ***Functionality of PRRs, secretion of IL6 and type-I interferons after stimulation***  
11 ***with PRRs prototypic ligands***

12 The cell culture supernatants of HepaRG cells were tested for the production of IL-  
13 6 following PRR stimulation by prototypic ligands involving NFκB activation. NF-κB is  
14 an important transcription factor responsible for the up-regulation of pro-inflammatory  
15 cytokines, including IL-6, tumour necrosis factor-α (TNF-α), and IL-8. Increasing  
16 doses of each ligand were used (**Fig. 4A**). Basically, except for TLR7, all PRRs  
17 ligands could induce the secretion of IL-6 in supernatants from 200 to 400 pg/mL.  
18 TLR9 stimulation induced to a lesser extent the production of IL-6 (100 pg/mL) with  
19 the maximal dose of CpG ligand (5 μM). Using a functional assay, we also  
20 demonstrated that biologically active type-I IFN could be detected in the supernatant  
21 of HepaRG cell after stimulation by RIG-I and MDA5 ligands only (**Fig. 4B**). Type-I  
22 Interferon could not be detected after stimulation by any other TLR ligands expected  
23 to induce interferon production, such as TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9, suggesting  
24 that the interferon levels produced after stimulation by their prototypic ligands may be  
25 under the detection threshold of the assay.

## Discussion

Hepatoma cell lines or transformed human hepatocytes are commonly used to study hepatotropic pathogens, however the relevance of these models is limited when studying the interplay between viruses (or other pathogens) and hepatocyte innate immunity. Indeed pathogen sensing, IFN response and NF- $\kappa$ B signaling are commonly altered in hepatoma cells (3). Alexopoulos et al. have reported that the degree of cellular responsiveness to several growth factors, inflammatory ligands, and TLR agonists was very different between PHHs and transformed cells even when both cell types were sensitive to the same ligand. The extent to which specific immediate-early signaling pathways are activated in these different cell types is strikingly different. Furthermore it has been observed that the patterns of cytokine secretion were also different even when a common transcription factor (NF- $\kappa$ B) was involved. The profound defects in TLR signaling observed in hepatoma cells was consistent with the hypothesis that innate immunity could play an important role in suppressing tumorigenesis (3). Indeed, immune cells may act in an anti-oncogenic fashion, apparently by recognizing and killing transformed cells (19). To survive, tumor cells must adapt to and avoid such immune surveillance (36, 38). The changes observed in hepatoma cells appear to reflect this latter paradigm: by damping down TLR and TLR-induced secretions of factors that mobilize and attract immune cells, hepatoma cells are presumably able to avoid immune recognition. The successful development of invasive, metastatic cancer may require the modulation of genes in a manner that inhibits activation of both innate and adaptive elements of the immune surveillance system. However, connections between tumor and immune cells are complex (7, 14). Tumor-associated macrophages, for example secrete factors that act as mitogens for cancer cells (15), and under these circumstances suppression of inflammation can interfere with tumor growth.

RNA levels for TLR receptors and a set of downstream signaling molecules appear to be lower in hepatoma cell lines than in PHHs, and are non modified in response to a wide range of TLR agonists (3). The lack of a robust response to TLR ligands as well as the impaired functionality of the interferon pathway in hepatoma cell lines make them of a limited interest to study innate immune response induced by an hepatotropic pathogen (17, 27). In contrast, PHHs and HepaRG cells that are non-cancerous, but functional for IFN signaling and permissive to HBV replication,

are more relevant models (9, 10). The relatively low replication rate of hepatotropic viruses (low rate for HBV and HDV, and virtually no permissivity to HCV) in HepaRG cells (a maximum of 20% of cells infected) might result, at least in part, from a cellular antiviral response mounted by cells against those viruses (26). Indeed, a strong HBV expression and replication after delivery of the HBV genome by a baculovirus vector could induce a potent IFN response that in turn restricts infection (24). This HepaRG cell line was expected to be a valuable tool to study hepatocyte antiviral innate immune responses, as it was shown to be very close to PHHs in terms of physiology (11). However, detailed features of this immune response were still unclear and the present study provides the first characterization and functionality of PRRs gene expression in an HBV susceptible and non-cancerous cell line, the HepaRG cell in comparison with PHHs.

In this respect, our study showed that the mRNA of all TLRs as well as cytoplasmic helicases RIG-I and MDA5, which detect intracellular viral dsRNA, are expressed in HepaRG cells. Interestingly, the relative mRNA expression level of these PRRs was similar in differentiated HepaRG and in PHHs, and both displayed a higher expression of TLR8 and a low expression of TLR 7 and 10 in comparison to the other TLRs. Besides, after differentiation into cholangiocyte-like and hepatocyte-like cells, the level of expression of PRRs analyzed appears to be similar in both cell types. Protein expression analysis showed that all TLRs were expressed in both HepaRG and PHHs. TLR3, 4, 5, 7, 8 and 9 were the most expressed TLRs in HepaRG, suggesting that post-transcriptional or post-translational regulations occur in HepaRG or PHHs. Similar regulation could happen with TLR7, as it was less expressed at the mRNA level. RIGI and MDA5 were also expressed at the protein level and highly inducible after interferon stimulation. The stimulation of the PRRs by their prototypic ligands could induce the expression of the targeted PRRs except for TLR6 and TLR9. These stimulations could also lead to the mRNA induction of several cytokines such as IL-6, with the exception of TLR7 and 9. However, TLR7 and 9 ligands could induce IFN- $\alpha$  and  $\beta$  mRNA expression implying that all these TLRs were functional. In humans, the expression of TLR7 and TLR9 is mainly confined to plasmacytoid dendritic cells and B lymphocytes. However, low levels of TLR7 and or TLR9 have been reported in other cell types, including hepatocytes (22), particularly in the setting of chronic inflammation (35). In addition,

1 the functionality of TLR3 and RIGI/MDA5 pathway was demonstrated after cell  
2 stimulation with extracellular dsRNA (poly I:C) and cytoplasmic dsRNA (lyovec-poly  
3 I/C) respectively showing an induction of IFN $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\lambda$  as well as ISGs (such as  
4 ISG56, **Fig. 3**). More importantly, after stimulation with prototypic ligands targeting  
5 PRRs, using different doses of ligands, IL-6 could be secreted and detected at high  
6 levels up to 500 pg/ml except for TLR9 and TLR7 stimulations which could induce a  
7 modest or no secretion of IL6 respectively. Furthermore, type-I interferon could be  
8 detected in cell supernatants after stimulation with RIG-I and MDA 5 ligands only.

9 Infections by hepatotropic pathogens can be cleared once innate immune  
10 activation and pathogen-specific T cell responses predominate over pathogen  
11 immune escape mechanisms, as it occurs in HAV infections, and in cases of  
12 resolution of acute HBV or HCV infections. Viral persistence in hepatocytes can  
13 occur by escaping both innate and adaptive immune responses, as observed in  
14 chronic HBV or HCV infections. HepaRG exhibits functional TLR and dsRNA-  
15 activated signaling pathways in contrast to cultured hepatoma cells (20). Indeed,  
16 cultured hepatoma cell lines present a profound defect in TLR signaling which is  
17 consistent with the hypothesis that innate immunity plays an important role in  
18 suppressing tumorigenesis (38) (redundant with the sentence page 15 / discussion).  
19 It appears unclear why hepatoma cell lines are unresponsive to a wide range of TLR  
20 agonists, but RNA levels for TLR receptor and a set of downstream signaling  
21 molecules appear to be lower in hepatoma cell lines than in primary hepatocytes (3).  
22 However, low responsiveness to ligands was observed even when the cognate TLR  
23 was expressed at apparently normal levels, suggesting that other factors must be  
24 involved. Our data show that HepaRG cells express functional PRRs. The activation  
25 of these PRRs leads to the production of cytokines, including cytokines bearing  
26 antiviral activity. This study opens doors to relevant and detailed analyses of  
27 hepatocyte-like cells response to hepatotropic viruses or other hepatotropic  
28 pathogens in the absence of non-parenchymal or liver resident immune cells.  
29 Therefore, the HepaRG cell line that maintains the functional properties of primary  
30 human hepatocytes provides a unique tool for the understanding of the interplay  
31 between the innate immune response and hepatotropic pathogens. This work may  
32 have potential applications to study the activation of hepatocyte innate immunity by

1 these pathogens, the evasion to innate immunity by these pathogens, as well as for  
2 future development of PRR ligands as therapeutic agents.

### 4 **Acknowledgments**

5 The authors would like to thank Lydie Lefrançois and Judith Fresquet for the isolation  
6 of primary human hepatocytes, as well as the staff from Pr Michel Rivoire's surgery  
7 room for providing us with liver resection. This work was supported by grants from  
8 ANRS (French national agency for research on AIDS and viral hepatitis; several  
9 grants from CSS4), FINOVI (Foundation for innovation in infectiology; project call  
10 n°#4), FRM (Foundation for medical research; DEQ20110421327), Hoffmann-La-  
11 Roche (U.S.A. division) and by INSERM core grants. This work was also supported  
12 by the DEVweCAN LABEX (ANR-10-LABX-0061) of the "Université de Lyon", within  
13 the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French  
14 National Research Agency (ANR).

# References

1. Ait-Goughoulte M, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. *Viruses* 2010 Jul;2(7):1394-1410.
2. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006 Feb 24;124(4):783-801.
3. Alexopoulos LG, Saez-Rodriguez J, Cosgrove BD, Lauffenburger DA, Sorger PK. Networks inferred from biochemical data reveal profound differences in toll-like receptor and inflammatory signaling between normal and transformed hepatocytes. *Mol Cell Proteomics* 2010 Sep;9(9):1849-1865.
4. Ank N, Iversen MB, Bartholdy C, Staeheli P, Hartmann R, Jensen UB, et al. An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J Immunol* 2008 Feb 15;180(4):2474-2485.
5. Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut* 2012 Dec;61(12):1754-1764.
6. Bowie AG, Haga IR. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol* 2005 May;42(8):859-867.
7. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004 Aug;21(2):137-148.
8. Estornes Y, Toscano F, Virard F, Jacquemin G, Pierrot A, Vanbervliet B, et al. dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8. *Cell Death Differ* 2012 Sep;19(9):1482-1494.
9. Gripon P, Diot C, Theze N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, et al. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* 1988 Nov;62(11):4136-4143.
10. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 26;99(24):15655-15660.
11. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* 2010;640:1-40.
12. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:23-61.
13. Heim MH. Innate immunity and HCV. *J Hepatol* 2013 Mar;58(3):564-574.
14. Hoffmann A, Xia Y, Verma IM. Inflammatory tales of liver cancer. *Cancer Cell* 2007 Feb;11(2):99-101.
15. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005 Oct;5(10):749-759.
16. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010 May;11(5):373-384.
17. Keskinen P, Nyqvist M, Sareneva T, Pirhonen J, Melen K, Julkunen I. Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology* 1999 Oct 25;263(2):364-375.
18. Khvalevsky E, Rivkin L, Rachmilewitz J, Galun E, Giladi H. TLR3 signaling in a hepatoma cell line is skewed towards apoptosis. *J Cell Biochem* 2007 Apr 1;100(5):1301-1312.
19. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007 Dec 6;450(7171):903-907.



20. Lanford RE, Guerra B, Lee H, Averett DR, Pfeiffer B, Chavez D, et al. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol* 2003 Jan;77(2):1092-1104.
21. Lecluyse EL, Alexandre E. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol* 2010;640:57-82.
22. Lee J, Wu CC, Lee KJ, Chuang TH, Katakura K, Liu YT, et al. Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Feb 7;103(6):1828-1833.
23. Liu S, Gallo DJ, Green AM, Williams DL, Gong X, Shapiro RA, et al. Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF-kappa B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2002 Jul;70(7):3433-3442.
24. Lucifora J, Durantel D, Testoni B, Hantz O, Levrero M, Zoulim F. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells. *Hepatology* 2010 Jan;51(1):63-72.
25. Maire M, Parent R, Morand AL, Alotte C, Trepo C, Durantel D, et al. Characterization of the double-stranded RNA responses in human liver progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Apr 11;368(3):556-562.
26. Marion MJ, Hantz O, Durantel D. The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol Biol* 2010;640:261-272.
27. Melen K, Keskinen P, Lehtonen A, Julkunen I. Interferon-induced gene expression and signaling in human hepatoma cell lines. *J Hepatol* 2000 Nov;33(5):764-772.
28. Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull* 2005 May;28(5):886-892.
29. Parent R, Marion MJ, Furio L, Trepo C, Petit MA. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 2004 Apr;126(4):1147-1156.
30. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006 Oct;45(4):529-538.
31. Preiss S, Thompson A, Chen X, Rodgers S, Markovska V, Desmond P, et al. Characterization of the innate immune signalling pathways in hepatocyte cell lines. *J Viral Hepat* 2008 Dec;15(12):888-900.
32. Protzer U, Maini MK, Knolle PA. Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol* 2012 Mar;12(3):201-213.
33. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010 Apr;138(4):1338-1345, 1345 e1331-1337.
34. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010 Mar 19;140(6):805-820.
35. Takii Y, Nakamura M, Ito M, Yokoyama T, Komori A, Shimizu-Yoshida Y, et al. Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 2005 Jul;85(7):908-920.
36. Teicher BA. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res* 2007 Nov 1;13(21):6247-6251.
37. Troadec MB, Glaise D, Lamirault G, Le Cunff M, Guerin E, Le Meur N, et al. Hepatocyte iron loading capacity is associated with differentiation and repression of motility in the HepaRG cell line. *Genomics* 2006 Jan;87(1):93-103.
38. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 2004 Jan;10(1):48-54.

Table 1. Primer sequences used for RT-qPCR

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
TLR1	caggccctcttctcgtaga	ttcctaaaggtagaagctgttcttca
TLR2	ctctcgggtgcggaat	cccgcctcactgtaagaa
TLR3	tttgcgaagaggaatgtttaaactct	cacctatccgttcttctgaactg
TLR4	tcttggtggaagttgaacg	gccacaccgggaataa
TLR5	gtaccctgactcgttct	ttctgcacccatgtga
TLR6	agtggaccagactcg	agttcgtaatggcacc
TLR8	tgagctgcgctaccac	cttctgccttcgggtt
TLR9	ggcccccggcttctt	caggagtgggtccactgtcttga
TLR10	gcattcccaccaggtatcataaac	aaagcccacatttacgcctatc
RIGI	gctgatgaaggcattgacattg	cagcattactagtcagaaggaagca
MDA5	cccatgacacagaatgaacaaaa	cgagaccataacggataacaatgt
IFN $\alpha$	gtgaggaaatacttcaaagaatcac	tctcatgatttctgcttgacaa
IFN $\beta$	gccgcattgacctgatgaga	gagatcttcagtttcggaggtaac
IL28b	taagagggccaaagatgcctt	ctggccaagacatcccc
IL29	gtgactttggtgctaggcttg	gcctcagggtccaattccc
IL6	accctgacccaaccacaaat	agctgcgcagaatgagatgagtt
ISG56	agccaacatgtcctcacagac	cttctaccactgtttcatgc
$\beta$ -actin	tggcattgccgacaggatgc	tctgctggagggtggacagcga
RPLP0	caccattgaaatcctgagtgatgt	tgaccagcccaaaggagaag

## Figure legends

### **Fig. 1. mRNA expression of PRRs and innate signaling pathways in dHepaRG**

**and PHHs.** A) RT-PCR analysis of PRRs expression in HepaRG cells and PHHs. The relative mRNA expression was normalized to housekeeping genes, RPLP0 and  $\beta$ -actin cDNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ). B) mRNA expression of PRR in dHepaRG cells, treated or not by EGF (10 ng/mL). RT-qPCR analysis of PRRs expression in dHepaRG cells were normalized to housekeeping genes and relatively compared to untreated dHepaRG cells. Micrographs represent light microscopy images of dHepaRG cells and PHHs (A) and dHepaRG cells treated or not with EGF (B).

### **Fig. 2. Protein expression of PRRs in HepaRG cells and PHHs.**

A) TLR expression analyzed by FACS. Black histograms represent stainings with the indicated TLR antibody, shaded gray histograms represent the isotype control, in PHHs and differentiated HepaRG (dHepaRG). B) Western-Blot analysis of RIGI and MDA5 in HepaRG and PHHs, with or without IFN $\alpha$  (1000 UI/mL) induction.

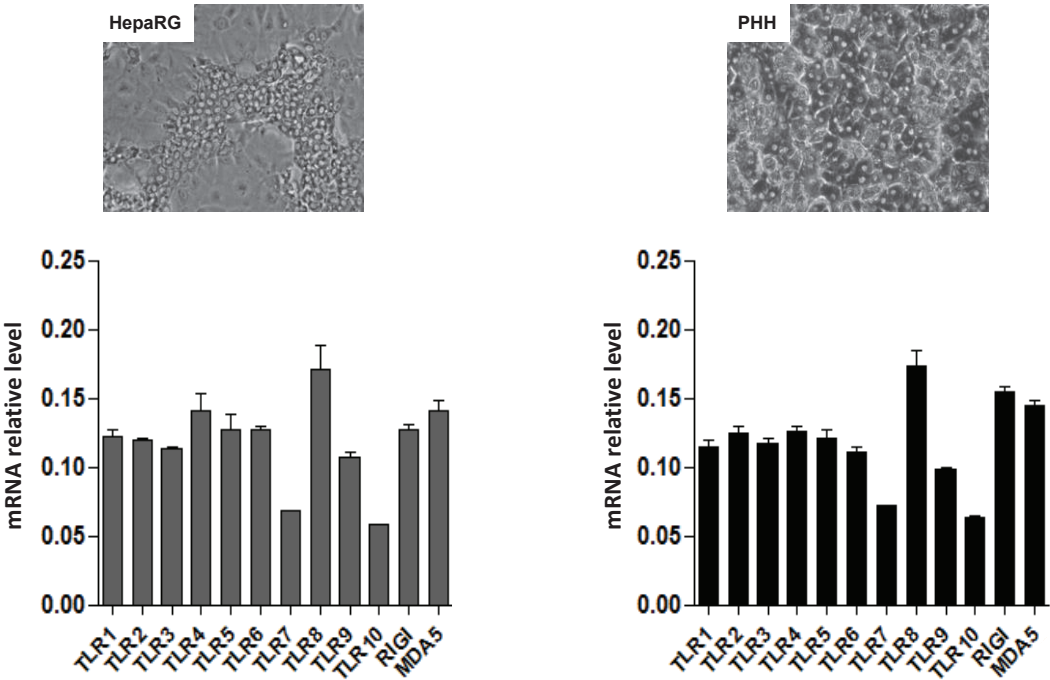
### **Fig. 3. Induction of PRR, cytokine, and ISG gene expression in HepaRG cells after stimulation with prototypic ligands.**

Gene expression was analyzed following 2h, 4h, 8h or 16h stimulation with prototypic ligands of TLR1/2 (P3C, 1  $\mu$ g/mL), TLR2 (HKLM,  $10^8$  cells/mL), TLR3 (Poly-I:C, 1  $\mu$ g/mL) TLR4 (LPS, 10 ng/mL), TLR5 (Flagellin, 5  $\mu$ g/mL) TLR6 (FSL1, 1  $\mu$ g/mL), TLR7 (Imiquinod, 10  $\mu$ g/mL) TLR8 (ssRNA40, 10  $\mu$ g/mL), TLR9 (CpG, 5  $\mu$ M) RIGI/MDA5 (Poly-I:C-Iyovec, 1  $\mu$ g/mL). After stimulation RT-qPCR were performed on targeted PRRs, IL-6, IFN- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IL-28B, IL-29 and ISG56 genes. The mRNA level expression was normalized to housekeeping genes and relatively compared to the non-stimulated control.

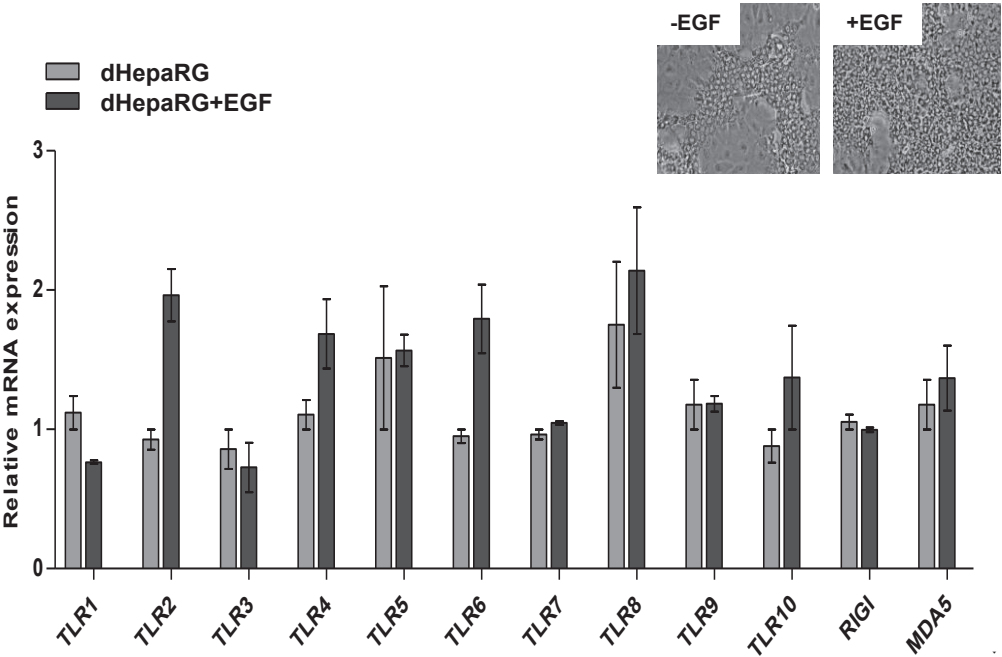
**Fig. 4. Functionality of PRRs.** A) ELISA analysis of IL-6 production upon 16h stimulation with prototypic PRR ligands. Differentiated HepaRG cells were stimulated with increasing doses of PRR ligands, low, representing the lowest dose, medium, the intermediate dose and high, representing the highest dose. B) Analysis of secreted type-I IFN upon prototypic ligand treatment. Differentiated HepaRG cells were stimulated with increasing doses of PRR ligands, 24h after stimulation, supernatant were tested along with non stimulated cells (NS) for type I interferon activity.

**Fig. 1. mRNA expression of PRRs and innate signaling pathways in differentiated dHepaRG cells and PHHs**

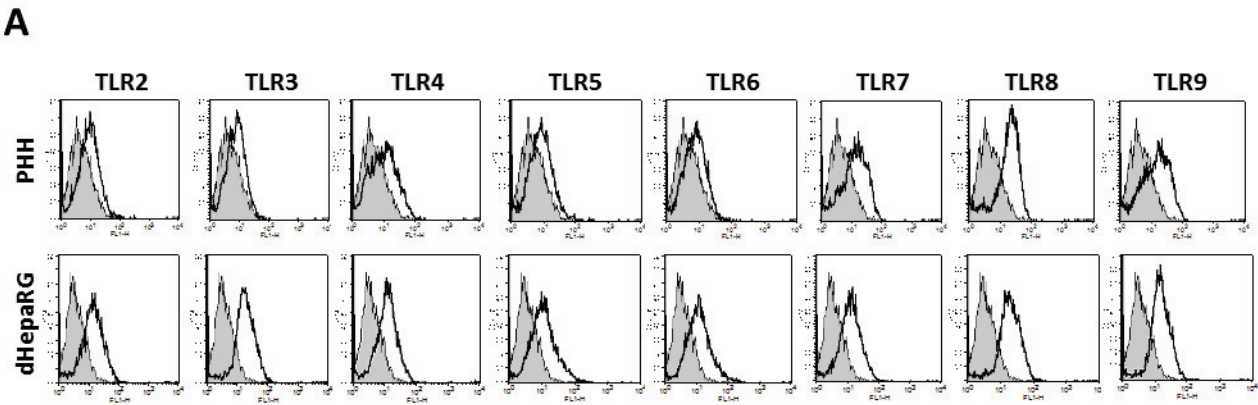
**A**



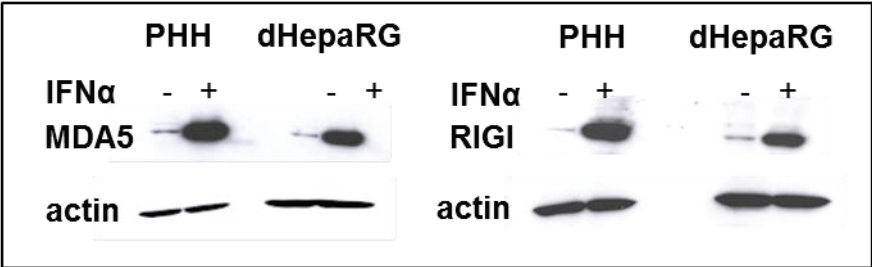
**B**



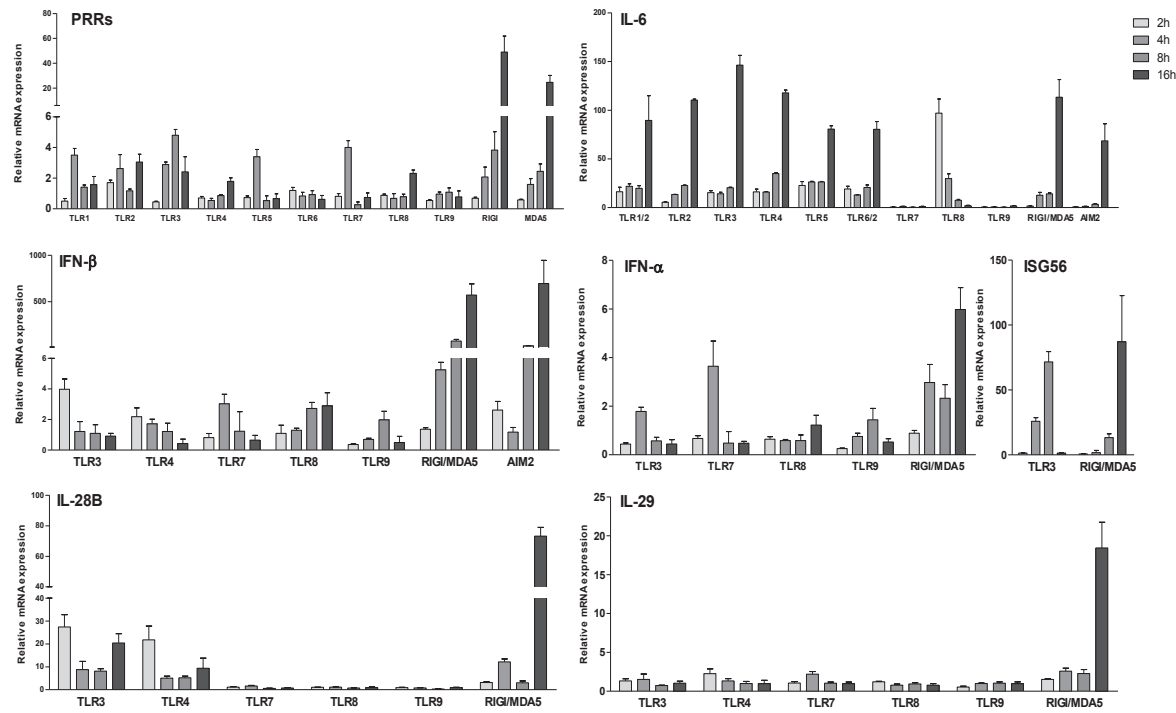
**Fig. 2. Protein expression of PRRs in HepaRG cells and PHHs**



**B**



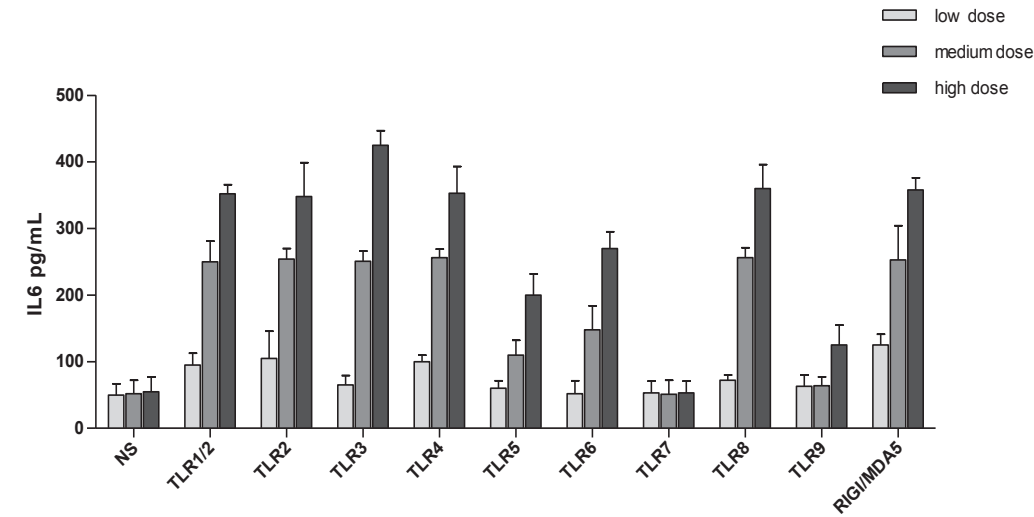
**Fig. 3. Induction of PRR, cytokine, and ISG gene expression in HepaRG cells after stimulation with prototypic ligands.**



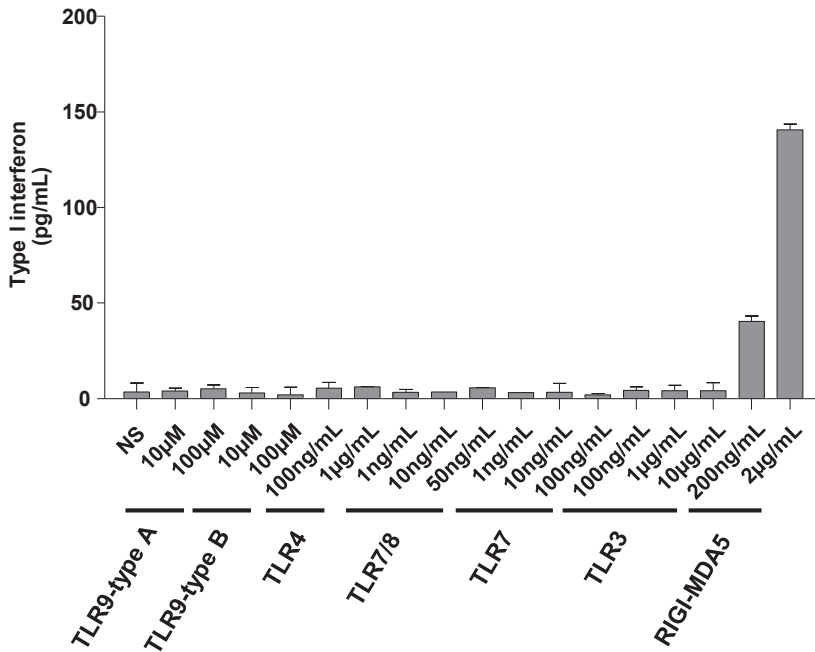


**Fig. 4. Functionality of PRRs.**

**A**



**B**



## Etude 2

### Early Inhibition of the Hepatocyte innate responses by Hepatitis B Virus facilitates Establishment of a Persistent Infection

(Soumis)

Souphalone Luangsay\*, **Marion Gruffaz\***, Malika Ait-Goughoulte, Nathalie Isorce, Barbara Testoni, Maud Michelet, Michel Rivoire, Massimo Tommasino, Simon Fletcher, Hassan Javanbakht, David Durantel<sup>¶</sup> and Fabien Zoulim<sup>¶</sup>

*\*contributed equally, <sup>¶</sup>contributed equally*



## **Early Inhibition of Hepatocyte Innate Responses by HBV facilitates Establishment of a Persistent Infection**

**Souphalane Luangsay<sup>1,\*</sup>, Marion Gruffaz<sup>1,\*</sup>, Malika Ait-Goughoulte<sup>1</sup>, Nathalie Isorce<sup>1</sup>, Barbara Testoni<sup>1</sup>, Maud Michelet<sup>1</sup>, Michel Rivoire<sup>3,4</sup>, Massimo Tommasino<sup>5</sup>, Simon Fletcher<sup>6</sup>, Hassan Javanbakht<sup>6</sup>, David Durantel<sup>1,2,¶</sup> and Fabien Zoulim<sup>1,2,7,8,¶</sup>**

*1. INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie (CRCL), Lyon, 69008, France*

*2. Université de Lyon, UMR\_S1052, CRCL, 69008 Lyon, France*

*3. Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, 69008, France*

*4. INSERM U1032, 69003 Lyon, France*

*5. International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO), 69372 Lyon, France*

*6. Hoffmann-La Roche Inc, Nutley, NJ 07110, USA*

*7. Hospices Civils de Lyon (HCL), 69002 Lyon, France*

*8. Institut Universitaire de France (IUF), 75005 Paris, France*

### **Additional Footnotes:**

*\*contributed equally, ¶contributed equally*

### **Address correspondence to:**

Pr. Fabien Zoulim or Dr. David Durantel

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), UMR Inserm 1052 - CNRS 5286, 151 cours

Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France ; Phone: + 33 4 72 68 19 70 ; Fax : +33 4 72 68 19 71 ;

E-mail : fabien.zoulim@inserm.fr, david.durantel@inserm.fr

### **Conflict of interest:**

MR and MT have nothing to declare

SL, MG, MAG, NI, BT, MM, DD, and FZ received a research grant from Hoffmann-La-Roche to perform experiments.

SF was employee of Hoffmann-La-Roche at the time of the study; HJ is employee of Hoffmann-La-Roche.

## Abstract

The evolution of HBV infection towards persistence or viral clearance may result from the nature of early interactions between the virus and hepatocyte innate immune responses. To date, the study of such interactions during the early step of infection has not been investigated in a relevant HBV infection model. We used a liver progenitor, differentiable, HBV-susceptible cell line, i.e. HepaRG cells, as well as primary human hepatocytes, and analyzed within 24 hours of HBV exposure, the early modulation of the expression of several pathogen recognition receptors, antiviral cytokines and interferon stimulated genes. We show that these hepatocytes could detect HBV and produce antiviral cytokines when HBV was experimentally delivered by a baculoviral vector (Bac-HBV), in the absence of any HBV proteins/antigens in the inoculum. In contrast, shortly after a more physiologic virus exposure, the stimulation of dsRNA-sensor pathways (by TLR3 or RIG-I/MDA5) was specifically and rapidly suppressed by HBV factors already present in the inoculum, without the need of *de novo* viral protein synthesis. This early inhibition was accompanied by a sharp decreased activation of several proinflammatory and antiviral cytokine expression (IL-6, IFN- $\beta$ , IL-29 and OAS-1). Our data provide strong evidence that HBV viral particles themselves can readily inhibit host innate immune responses upon virion/cell interactions, and may explain the slow onset of adaptive immune responses to HBV infection, which in turn may facilitate progression to chronicity.

## Introduction

Viral hepatitis represents a major health problem worldwide, with hundreds of millions of chronic carriers who have a high risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma<sup>1</sup>. Hepatitis B virus (HBV) is widespread in the general population; 2 billion people have been exposed to the virus, and more than 240 millions are chronically infected (WHO Hepatitis B, Fact sheet N°204, July 2012). To achieve this rate of chronicity, HBV has evolved multiple strategies to evade the host innate and adaptive immune responses<sup>2</sup>. For example, during the initial phase of an acute infection and later, during the immune tolerance phase of a chronic HBV infection<sup>3, 4</sup>, the virus replicates at very high level without apparent activation of the immune system. To break this immuno-tolerance and restore immune control of the virus, virus-mediated inhibitory mechanisms would have to be defeated/unlocked in an interventional therapeutic perspective. A better knowledge of the underlying molecular mechanisms responsible for virus-induced blockades of immune responses is crucial before envisaging such strategies to improve the success of current antiviral treatments<sup>5</sup>.

Evasion of innate responses mounted by professional immune and non-professional cells, which are at the front line of host defenses, is a common feature in both acute and persistent viral infection, but is crucial for the establishment of the latter<sup>6-8</sup>. In the case of many viral infections, including HCV and HIV, which are persistent viruses and of particular importance in human health, strategies to subvert innate immunity within infected cells, in their microenvironment, as well as in a more systemic manner, are set very early after the onset of the infection<sup>9, 10</sup>. These inhibitions are maintained and even strengthened in the

long term to ensure persistence. An understanding of how viruses inhibit innate responses in the acute phase of infection is therefore of major importance.

Most viruses are detected early after infection by both immune or/and infected cells via exposition of their pathogen associated molecular patterns (PAMPs), which can be envelope glycoproteins, other viral proteins, their genomes (often naked nucleic acids) or intracellular intermediates of replication (e.g. dsRNA structures, DNA/RNA hybrids, uncapped or IRES containing vRNA) to pathogen recognition receptors (PRRs). The engagement of these receptors, mainly represented by the Toll like receptors (TLRs), RIG-I like receptors (RLRs) and NOD-like receptors (NLRs), may direct effective host innate antiviral responses through the secretion of various interferons (IFNs; type I or III) and pro-inflammatory cytokines <sup>11</sup>.

*In vivo* studies of the early cellular innate responses to HBV infection have been hampered by the difficulty of identifying and recruiting patients in the acute phase of HBV infection. Patient recruitment in the early phase of infection is a problem since systematic disease may not be recognized until the virus has spread through the entire liver and replicated for many weeks at high titres. The limited numbers of experimental models to study the early step of the host innate responses to HBV infection has been an additional limitation. Thus, it is still unclear if HBV is recognized by the innate immune system and/or if the virus can actively suppress or avoid early antiviral responses that drive the control of HBV infection <sup>2, 12-14</sup>.

The few data obtained in acutely infected humans, chimpanzees and woodchucks have shown that during the natural course of HBV infection, the activation of innate responses is predominantly weak or absent <sup>15-18</sup>. In particular, a seminal work performed in chimpanzees, has shown that HBV does not induce a strong modulation of gene expression in the liver of



infected animal as compared to HCV, another hepatotropic virus<sup>16</sup>. Following this work HBV was qualified as a “stealth virus”<sup>19</sup> as opposed to HCV, which is capable to strongly activate host gene expression, including those involved in innate immune responses. A stealth virus can be a virus that does not induce measurable innate responses because of lack of detection by PRRs, or a virus that is able to actively inhibit nascent responses. In this respect, some other data suggested that, during chronic infection, HBV could negatively regulate host immune responses by interfering with TLR expression and signaling pathways<sup>20-22</sup>, or by inhibiting IFN response<sup>23-27</sup>.

However, to date no very early kinetic interaction study between HBV and host hepatocyte has been performed to determine whether the virus can be initially detected by host cells, modulate host immune gene expression, and potentially inhibit innate responses. Only one study, performed in primary human hepatocytes (PHHs) cultures containing Kupffer cells (KCs), showed that HBV could induce the transient production of IL-6, thus suggesting that the virus could be initially sensed, at least by liver macrophages, and lead to the production of pro-inflammatory cytokines. However, HBV could, 24 hour (hr) after the onset of infection, inhibit the production of IL-6 by a yet unknown mechanism<sup>28</sup>. Moreover, the fact that primary hepatocyte cultures are often contaminated with non-parenchymal cells (NPCs), including liver resident immune cells, precludes any definitive conclusion as to the level of implication of each cell type in the observed immune modulation in this system.

To better characterize the early interplay between HBV and hepatocyte innate immunity in terms of recognition and evasion, we used a non-transformed human hepatocyte cell line, HepaRG, which is permissive for persistent HBV infection and devoid of contamination by immune cells<sup>29-31</sup>. We previously characterized the functional expression of the main PRRs

expressed in these cells (TLR1-10, RIG-I/MDA5, NOD1) and showed that like PHHs, HepaRG cells displayed a similar expression pattern of these innate sensors and were competent for the innate immune signalling pathways in terms of cytokine expression and secretion (IL-6 and type I IFNs) (data not shown). In addition, we previously showed in these cells that HBV can be detected and its replication was sharply inhibited by the induction of a specific type-I IFN response when a strong and synchronized intracellular HBV replication was obtained experimentally by delivery of the HBV genome by a baculovirus vector (i.e., non physiological delivery of the genome)<sup>32</sup>, suggesting that *de novo* produced viral PAMPs are immunologically sensed by hepatocytes.

In this study, we describe the early kinetics of anti-HBV innate responses and their regulation by HBV following natural infection of “pure” human hepatocytes. We demonstrate that hepatocytes themselves could sense HBV, when delivered to cell by baculoviral transduction, and initiate an efficient antiviral response. In contrast, this antiviral response was abortive in the context of a physiological HBV infection. In this case, the suppression of innate responses was exerted by viral component(s) within the inoculum without the need of *de novo* viral synthesis. This active suppression of pathogen-sensing pathways in the very early phase of infection, which prevented the establishment of a competent innate immunity, facilitated the development of a persistent infection.

## Results

### *IL-6 production during self-resolving and persistent infection of hepatocyte like-HepaRG cells*

To examine the modulation of hepatocyte innate immunity during self-resolving and persistent HBV infection *in vitro*, HepaRG cells were either infected with recombinant HBV or transduced with Bac-HBV, a previously described recombinant baculovirus carrying 1.1 HBV genome unit, which is able to launch synchronized and strong intracellular HBV replication by passing the HBV entry step and delivering HBV genome to the nucleus<sup>32, 33</sup>. The former infection model leads to a persistent infection which can last for months in HepaRG cells<sup>31</sup>, whereas the latter leads to a strong initial replication peaking at 24 hr post-transduction (p.t.) followed by a non-cytopathic, interferon-driven, elimination of HBV replicative intermediates (referred as “clearance of viral replication”)<sup>32</sup>.

In HepaRG cells transduced by Bac-HBV, the rapid and transient synthesis of HBV RNA correlated with a strong secretion of IL-6 ( $\approx 1500$  pg/ml), which peaked at 24 hr p.t., remained high until day-3 p.t., before returning to baseline at day-6 p.t. (**Fig. 1A**). IL-6 was chosen as a prototypic pro-inflammatory cytokine. The elimination of replication intermediates in those cells was very fast, as previously shown<sup>32</sup>, and likely due to the antiviral effect of secreted IFNs and other inflammatory cytokines, such as IL-6<sup>28</sup>. It is important to note that HepaRG cells transduced with an identical amount (i.e. 100 pfu/cell) of control baculovirus (Bac-GFP) did not lead to the release of IL-6, thus showing that IL-6 secretion was the consequence of the synthesis of HBV replicative intermediates. In sharp contrast, cells infected with either a low (**Fig. 1B**) or high (**Fig. 1C**) dose of HBV virions showed only a weak ( $\approx 200$  pg/mL) and transient secretion of IL-6 (detection only at 24 hr

post infection (p.i.); undetectable after), and was not associated with an inhibition of HBV replication, as intracellular HBV RNA started to increase at day-3 or day-6 according to initial multiplicity of infection. It is worth noting that both transduction with Bac-HBV and a high multiplicity of infection with HBV led to similar amount of viral RNA in cells (**Fig. 1A and 1C**). However in the case of viral transduction, the maximal accumulation of HBV RNA occurred shortly (i.e. before 24 hr p.t.) after the onset of infection and was associated with a strong production of IL-6, whereas in the case of natural infection with a high multiplicity of infection, HBV RNA started to accumulate only at day-3 after a lag phase. Similar results were obtained with other cytokines including type I and III IFNs (data not shown). These results suggest that a “physiological” HBV infection does not induce a significant innate response in HepaRG cells and inevitably leads to persistence, whereas during an experimental, baculovirus-mediated infection, strong and rapid production of HBV RNA induces a strong innate response, leading to the elimination of replicative intermediates *in vitro*.

#### ***Fine analysis of the modulation of innate gene expression in self-resolving and persistent infection of HepaRG cells***

According to results obtained in the chimpanzee model <sup>16</sup>, HBV does not modulate host gene expression. One main advantage of *in vitro* HBV infectable models, over biopsy-based approach in chimpanzees, is that the hepatocyte innate responses to HBV can be monitored by sensitive RT-qPCR to detect very early subtle variations in the expression of host innate genes in a time course-dependent manner. To this end, we demonstrated that a productive HBV infection, measured by HBeAg and HBsAg quantification, was obtained several days

post-infection in PHH and HepaRG cells with an initial inoculation time as short as 2 hr  
(**Supplementary figure 1 A-D**). In a previous work in which the analysis of the impact of HBV  
on host innate gene expression was performed, longer inoculation time were used, thus  
precluding the observation of very early events<sup>28</sup>.

Rather than going for pan-genomic analysis, we have chosen to focus on the expression of  
representative PRRs (including TLR1-9, RIG-I and MDA5), important signaling, transcription  
or regulatory factors (MyD88, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, SOCS1), as well as some antiviral/pro-  
inflammatory cytokines (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-29, IL-6, IL-1 $\beta$ ) and two prototypic interferon  
stimulated genes (ISGs; ISG56 and OAS1). A 4 to 20 fold induction of the expression of most  
RNA sensors (RIG-I > MDA5 > TLR3 = TLR7), 10 fold induction of TLR2, and no change in the  
expression for other PRRs was observed in Bac-HBV-transduced cells compared to control  
(i.e., Bac-GFP) at 24 hr p.t. (**Fig. 2A**). The expression of TLR2 increased progressively from 2  
hr to 24 hr, whereas the upregulation of other genes was seen only at 24 hr p.t. (**Fig. 2A**). In  
contrast, following HBV infection, the modulation of expression of PRRs markedly differed in  
terms of kinetics and intensity. Interestingly, the subset of PRRs induced upon physiological  
HBV infection were different, with TLR2, 4, 8, and 9 being up-regulated whereas no  
modification of the expression of TLR3, 7, RIG-I and MDA5, which are also ISGs, was  
observed (**Fig. 2B**). For targeted PRRs, a small bell-shape curve induction with a modest but  
reproducible peak between 4 hr and 8 hr p.i, was observed. The expression of several PRR-  
associated intracellular signaling pathways was also evaluated in the Bac-HBV-transduced  
(**Fig.2A**) and HBV-infected (**Fig.2B**) cells. A significant increase of MyD88, IRF7, IRF9, STAT1  
and SOCS1 expression was also observed, whereas IRF3 was not modulated, which was likely  
due to its high basal expression in hepatocytes (data not shown). By contrast, the relative

expression of these intracellular signaling markers in HBV-infected cells was modestly induced ( $\leq 2$  fold) (**Fig.2B**).

Following Bac-HBV transduction, the expression of all antiviral/pro-inflammatory cytokine genes was significantly up-regulated, IFN- $\beta$  being the most induced transcript (**Fig. 3A**). Corroborating this increased gene expression at RNA level, a measurable secretion of IFN- $\gamma$  (20 pg/ml), IFN- $\alpha$  (30 pg/ml), and IL-6 (500 pg/ml) in the supernatant of Bac-HBV-transduced cells (compared to the Bac-GFP control) was observed at 24 hr p.t. (**Fig. 3C**). Again in sharp contrast, following a natural HBV infection, a weak but significant gene induction of type I, type III IFNs and IL-6 expression was observed between 4 hr to 8 hr p.i., which rapidly returned to baseline within 24 hr p.i. No induction of ISG (ISG56 and OAS1) expression was detected in HBV-infected cells (**Fig. 3B**). As a result of this weak increase of gene expression, there was no detectable secretion of cytokines in the supernatant of HBV-infected cells (**Fig. 3D**). In PHHs, as for HepaRG cells, a weak and transient innate response was also observed upon HBV infection (**Fig. 3E**), despite a higher infectivity rate and was similarly associated with the establishment of a persistent infection (**Fig. S1A-D**).

Therefore, a strong HBV replication could be easily sensed by innate receptors and induced potent antiviral responses, which in turn led to the elimination of replicative intermediates, when Bac-HBV was used to launch the HBV intracellular replication cycle. In contrast, with a more physiological HBV infection, a modest, transient response, with no production of cytokines in the supernatant, that can be qualified as abortive response, was observed and associated with persistence of replication. Since such responses could be measured at least at the level of gene expression, it does indicate that HBV was sensed by cells, but the virus seemed to rapidly disarm this nascent response. The next step was to

determine whether HBV is able to inhibit the hepatocyte innate responses engaged by various sensors.

***HBV actively represses dsRNA-mediated innate responses in hepatocytes shortly after the onset of infection***

To investigate whether HBV could rapidly repress hepatocyte innate responses, HepaRG cells were infected with HBV at low or high multiplicity for 24 hr, then stimulated by various PRR agonists known to induce the production of IL-6 in these cells (data not shown), to measure the induction of the innate response. Whereas stimulation of TLR5 (Flagellin) or TLR6 (FSL-1) receptors led to a stronger secretion of IL-6 in HBV-infected cells in comparison to the stimulated non-infected hepatocytes (production of IL-6 in control mock-infected cells represented 100%), stimulations of TLR2 (Pam3CSK4), TLR4 (LPS) or TLR7/8 (ssRNA) led to similar IL-6 protein secretion. In sharp contrast, stimulation of dsRNA sensors (TLR3 and RIG-I/MDA5) with either poly(I:C) or transfected poly(I:C), led to significantly less IL-6 protein secretion by HBV infected cells as compared to stimulated mock-infected hepatocytes (**Fig.4A**). These results strongly suggest that HBV may preferentially repress the dsRNA pathways rather than the other innate sensor pathways, under our experimental conditions. Interestingly, analysis of the induction of selected host innate gene expression in poly(I:C)-stimulated cells confirmed similarly a strong inhibition reaching 60-70% at the highest multiplicity of infection for IL-6 gene expression, but also for type I and type III IFNs (IFN- $\beta$ , IL-29) and for a prototypic ISG (OAS1) in HBV-infected hepatocytes (**Fig.4B**). Although this HBV-mediated inhibition of TLR3, RIG-I/MDA5 pathways by poly(I:C) seemed to be dependent of the amount of virus used to initially inoculate HepaRG cells, it seemed that a very low quantity of HBV virus (i.e. 1 vge/cell) was sufficient to significantly repress the



expression of IFN- $\beta$ , IL-29 and IL-6 in infected hepatocytes (**Fig.4B**). Similar observations were also made in HBV-infected PHHs at both RNA (IFN- $\beta$ , IL-29, IL6, OAS1) and protein levels (IL-6, IFN- $\lambda$  and IFN- $\beta$ ) following poly(I:C) stimulation (**Fig. S2 A-B**). In addition, we could observe a significant inhibition of these genes 24 hr following Bac-HBV supertransduction in HBV-infected HepaRG cells compared to mock-infected cells supertransduced with Bac-HBV, which thus suggests that HBV could suppress the strong induction of the innate response (**Fig. S3**) mediated by Bac-HBV alone (**Fig. 3A**). Moreover, the repressive effect of HBV on the dsRNA-mediated innate response observed after only 24 hr of inoculation with HBV was maintained after 12 days of infection when HBV infection is well established, which suggests that HBV is capable to induce a long lasting inhibition of the dsRNA-mediated innate response in infected cells (**Fig. 4C**).

***The very early inhibition of the dsRNA-mediated innate response in hepatocytes does not require de novo viral protein synthesis, but is due to viral proteins present in the HBV inoculum***

So far the inhibition of the dsRNA-mediated innate response in hepatocytes was measured after 24 hr of inoculation with the virus. To determine whether this inhibition could be set even earlier, we shortened the inoculation time down to 2 hr. Cells were inoculated with HBV for either 2, 4, 8 or 24 hr and stimulated for 3 additional hour with poly(I:C) after removal of the viral inoculum. In this setting, the HBV-mediated inhibition of IFN- $\beta$  and IL-29 gene expression and to a lesser extent of OAS1 and IL-6 gene expression seemed to occur very rapidly after the virus addition; in fact, as early as 2 hr after virus inoculation. Interestingly, the inhibition of expression of IFN- $\beta$  and IL-29 upon poly(I:C)

stimulation reached its maximum after only 4 hr of viral exposure (**Fig. 5A**), which strongly suggests that no viral proteins were required.

To further demonstrate that no viral replication (i.e. no *de novo* production of replication intermediates and viral proteins) was needed to explain the very early inhibition of dsRNA-mediated innate responses in hepatocytes, the HBV inoculum was UV-inactivated (UV-HBV) prior to infection of HepaRG cells. We first demonstrated that a 60 min UV-treatment was sufficient to completely abrogate viral replication (**Fig. S4**). We then stimulated non-UV and UV-inactivated HBV inoculated cells with poly(I:C), to measure the impact on induction of dsRNA-mediated innate gene expression (**Fig. 5B**). In both non-UV and UV-HBV exposed cells, a comparable strong inhibition of the induction of innate gene expression (IFN- $\beta$ , IL-29, IL-6 and OAS1) was observed, demonstrating that an HBV factor (or host factor associated with HBV virions) present in the inoculum was sufficient to mediate a prompt and strong repression of the TLR3 and RIG-I/MDA5 signaling pathways. This in turn may be responsible for the lack of development of a competent innate response when the amount of viral RNA increased suddenly at day-6 p.i (Fig. 1B) and may correlate with the persistence of infection.

To identify which viral determinants (or host factor associated with HBV virions) could be responsible for the suppressive effect on the innate response, we purified through a sucrose gradient each viral component of the HBV inoculum (i.e. infectious viral Dane particles, subviral particles (HBsAg), and HBeAg) (**Fig. 6A**). It was shown previously that HBsAg and HBeAg could interfere with the production of antiviral cytokines in the supernatant of non-parenchymal cells exposed to TLR3 or RIG-I/MDA5 agonists in a mouse model <sup>22</sup>. HepaRG cells were exposed with either a full inoculum (HBV) or to the various purified viral components including infectious Dane particles, subviral particles SVPs (i.e. HBsAg), and

304 HBeAg for 24 hr. The concentration of infectious particles, SVPs and HBeAg was harmonized  
305 to that of full inoculum as follow: HBsAg at 5 ng/10<sup>6</sup> cells, HBeAg at 4.4 NCU/10<sup>6</sup> cells, and  
306 HBV DNA at 100 vge/cell. After 24 hr of exposure to HBV or various viral components, the  
307 impact on IL-6, IFN- $\beta$ , IL-29, and OAS1 gene expression following poly(I:C) stimulation was  
308 evaluated. Whereas IL-6 expression was significantly inhibited by each viral component, a  
309 strong inhibition of type I/III IFNs and OAS1 gene expression was only observed with the HBV  
310 full inoculum and purified infectious Dane particles (**Fig.6B**), thus identifying a particular  
311 regulation of IFNs and interferon-stimulated genes by a viral (or host) protein(s) contained in  
312 Dane particles, which is different from HBsAg and HBeAg..

313

## Discussion

Understanding the mechanisms by which HBV can establish a persistent infection of hepatocytes is critical to develop future strategies to control viral infection. Among them, HBV may interfere with host early innate responses, including responses from circulating or intra-hepatic immune cells or directly from infected hepatocytes. In this study, we used two relevant hepatocyte culture models, based on “immunocompetent” PHH and HepaRG cells, the latter being also devoid of contaminating NPC or liver resident immune cells (data not shown), to decipher how early interactions between HBV and infected hepatocytes may lead to the establishment of a persistent infection or, on the contrary, to the elimination of HBV replicative intermediates.

Collectively, our results showed that HBV could rapidly impair the hepatocyte antiviral responses mediated by the host viral recognition system. When HBV replicates at high levels in hepatocytes after Bac-HBV transduction, this triggers a strong antiviral response that could not be counteracted by the virus, leading to the elimination of replicative intermediates. However, in the context of a more physiologic HBV infection with a complete viral inoculum (i.e., containing infectious Dane particles, HBeAg and SVPs/HBsAg), HBV induced only a transient and modest increase of interferon, ISGs, and pro-inflammatory gene expression, which was associated *in fine* to a persistent infection. We provide evidence that HBV actively and specifically blunted viral recognition during the very early phase of infection. Because inhibition of the hepatocyte innate response already occurred within the first 24 hr of infection and was maintained until at least 12 days after infection, which is considered as a “persistent” infection in cell culture<sup>31</sup>, our results may in part explain why HBV was previously considered as a stealth virus<sup>16</sup>. Furthermore, we showed that HBV

components and/or host factors associated with HBV and present in the viral inoculum were necessary and sufficient to suppress the innate response driven by the dsRNA sensors, to enable the persistence of HBV infection in the hepatocytes. However, neo-synthesis of viral proteins in infected cells beginning a few hours post infection, and thereafter, may be responsible for amplification of the inhibition phenomenon and its maintenance over time.

By studying the modulation of interferon, pro-inflammatory, and ISG gene expression within hours of exposure to the virus, we have confirmed that HBV can be initially sensed by hepatocyte PRRs. The fact that HBV could be sensed *in vitro* in primary hepatocyte cultures was previously shown by Hösel and coworkers<sup>28</sup>. However, our detailed kinetic studies enabled to point out an early, weak and transient up-regulation of the expression of downstream genes, which were not observed previously, because monitored too late after the onset of infection, i.e. when the virus had already established inhibitory strategies. The identification of the PRRs involved in the sensing is yet to be done. If one considers that cells respond to pathogens by inducing a positive feedback expression of sensors involved in their detection, then we can speculate that TLR2, 4, 8 and 9 may be involved in the detection of HBV. Knock-out experiments will be needed to clearly determine the set of sensors that are responsible for the early detection of HBV. Regarding the late detection of HBV in replicating cells, we can also speculate that dsRNA sensors may be involved in the detection of a yet to be determined viral PAMPs, which could be the replicative intermediate pre-genomic RNA that harbors hairpin structures<sup>34</sup>. Two convergent sets of data bring us to this hypothesis. When HBV replicates at high levels after experimental delivery by a baculoviral vector, the positive feedback expression of TLR3 and RIGI/MDA5 is drastically increased. Moreover, we have shown here that HBV is capable to inhibit dsRNA-mediated innate immunity in hepatocytes very early after the onset of infection. This might be important for the virus to

maintain high levels of pgRNA and its indispensable replicative intermediates. Invalidation of dsRNA-sensing capacity in HepaRG cells should help in definitely addressing this point. HCV, another hepatotropic virus, which is sensed by TLR3 and RIGI/MDA5 sensors, is capable to inhibit these signaling pathways by encoding a serine protease, which cuts TRIF and MAVS the two main adaptors of those pathways<sup>35</sup>

While it is not yet established which sensors are involved in the detection of HBV virions and intracellular intermediates of replication, our data clearly demonstrate the particular ability of the virus to efficiently and promptly inhibit, within 2 hours of viral exposure and in the absence of *de novo* viral protein synthesis, the TLR3 and RIG-I/MDA5-mediated innate immunity. While HBeAg and SVPs containing HBsAg alone seemed sufficient to down-regulate the IL-6 response at a comparable level to infectious Dane particles and the whole HBV inoculum, neither HBeAg nor HBsAg could repress the type I/III IFNs and ISGs response when cells were exposed to a complete HBV inoculum, which contained the same viral protein concentration (i.e HBsAg at 5 ng/10<sup>6</sup> cells or HBeAg at 4.4 NCU/10<sup>6</sup> cells) (Fig. 6B). Only viral components of the infectious Dane particles (i.e. HBcAg, viral polymerase, HBV genome, or host-associated proteins)<sup>36</sup> seemed to exert a specific inhibition of the IFN response. Further studies will be needed to determine which of these viral or host components composing the Dane particle could rapidly impact on the IFN response and by which mechanisms. Recently, Wu and coworkers<sup>22</sup> showed, in primary murine hepatocytes, a significant suppression of NFkB activity and to a lesser extent of IFN-β secretion in TLR3 stimulated primary murine hepatocytes, LSEC and Kupffer cells exposed to human HBV (virions, HBeAg, HBsAg) that had been produced by an immortalized hepatocyte cell line derived from primary mouse hepatocyte cultures (HBV-met cells)<sup>37</sup>. However, in this setting, the consequences on HBV infection could not be studied, as murine hepatocytes are not

susceptible to HBV. In addition, the authors observed the inhibition of the IL-6 response in the HBV-met cells following TLR4, TLR7 and TLR9 stimulation, which implies that human HBV could suppress the murine hepatocyte innate responses <sup>22</sup>. In our model of human hepatocyte infection by HBV, none of these sensors was modulated by HBV, at least early after the onset of the infection, and TLR9-mediated IL-6 response was poorly induced in PHH or in HepaRG cell cultures (data not shown). Another interesting question would be to know whether HBV may employ distinct evasion strategies depending on the cell type. The mechanism described here may be hepatocyte specific, while HBV may adopt other suppressive mechanisms on immune cells as described elsewhere in human monocyte and dendritic cell populations <sup>38-46</sup>

Our results shed light on the early interplay between HBV and hepatocytes and demonstrate a suppressive effect of HBV on hepatocyte innate responses which facilitates the establishment of a persistent infection. Further studies are now required to decipher the inhibitory mechanisms mediated by the different components of HBV during the early phase of infection in the liver microenvironment. The understanding of the host-virus interactions and the mechanisms that underlie the regulation of innate responses of parenchymal and non-parenchymal liver cells is an essential step for the development of future treatment intervention targeting specifically the HBV-induced repression of innate responses in the infected liver.



## Methods

### *HBV viral inoculum*

The HBV inoculum was concentrated from HBV stably transfected HepG2 cell line, clone 2.2.15 (HepG2.2.15) cultivated in DMEM's medium (Gibco), supplemented with 2% fetal bovine serum (Scientific, Waltham, MA, USA), penicillin/streptomycin 50 U/mL (Invitrogen), glutaMax 2mM (Invitrogen), 2% DMSO (cell culture grade, Sigma), 110 µg/ml sodium pyruvate (Invitrogen) and non-essential amino acids (Invitrogen). HepG2.2.15 supernatant was filtered (cut-off of 0.45µm), complexed to polyethyleneglycol (PEG<sub>8000</sub>; stock at 40% in OptiMEM) 8% final overnight at 4°C with gentle shaking and centrifuged at 3500g for 1 hr to precipitate HBV virions and viral proteins (HBsAg and HBeAg) and resuspended in William's medium (Gibco). A control mock "HBV-negative" inoculum was concentrated from HepG2.2.15 cells cultured under the same condition, but with addition of lamivudine (100µM) to block the production of infectious Dane particles. After PEG precipitation and resuspension in the same volume of William's medium as the HBV inoculum, the supernatant was filtered on centrifugal filters devices (Amicon Ultracel 10K, Millipore) to remove residual virions and viral proteins (mock control). The mock supernatant was then analyzed by ELISA for the absence of HBsAg and HBeAg. After DNA extraction (QIAmp Ultrasens Virus kit, Qiagen), HBV inoculum was titered by qPCR with forward 5'-GCTGACGCAACCCCCACT-3' and reverse 5'-AGGAGTTCCGAGTATGG-3' probes using a standard curve from a quantified HBV encoded plasmid. All preparations were tested for the absence of endotoxin (Lonza Verviers, Belgium).

### *HBV virion and viral protein purification*

Infectious particles (Dane particles) were purified from the PEG precipitated HBV inoculum by ultracentrifugation through sucrose density gradients. 2 ml of 20, 30, 40, 50% (w/w) sucrose in a solution containing 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA were successively layered in an ultracentrifuge tube. The HBV inoculum was layered on this sucrose gradient, and ultracentrifugation was performed at 35000 rpm for 16 hr at 4°C in a Beckman SW41Ti Rotor. Fractions were collected from the top to the bottom of the gradient. Each fraction was tested for sucrose density, HBV DNA, HBeAg and HBsAg, in order to isolate and identify each fraction. To eliminate sucrose contamination, each fraction was diluted in William's medium to obtain less than 1% of sucrose, precipitated with PEG 8% and resuspended in William's medium in the same volume as the HBV inoculums. Further analysis confirmed by transmission electron microscopy 1200EX (JEOL) the intact shape of the Dane particles and HBV replication in the Dane particle-infected HepaRG cells was assessed to confirm their infectivity (data not shown). The concentrations of HBsAg and HBeAg were measured by commercial immunoassay kits according to the manufacturer's protocols (Autobio Diagnostics Co., China).

#### ***Human hepatocyte culture and HBV infection***

The human liver progenitor HepaRG cell line described by Gripon et al <sup>29</sup> was cultured in complete William's medium and differentiated by the addition of 1.8% dimethylsulfoxide (DMSO) for 2 weeks, as previously described <sup>31</sup>. Primary human hepatocytes were prepared from surgical liver resections after informed consent of the patient (kindly provided by Pr. Rivoire, Centre Léon Bérard, Lyon), as previously described <sup>47</sup>. Depending on the experiment, cells were inoculated with HBV or its control mock (depleted from HBsAg, HBeAg and infectious Dane particles) in complete William's medium supplemented with 4% PEG (PolyEthyleneGlycol, Fluka) at 37°C.

### ***Baculovirus vectors and cell transduction***

A 1.1x genome-length HBV recombinant baculovirus vector (Bac-HBV) (genotype D, serotype ayw, accession number in GenBank: V01460) was produced for this study as previously described<sup>33</sup>. A baculovirus vector containing the genome encoding for the green fluorescence protein (Bac-GFP) was used as a control. Baculoviral transduction of mammalian cells was performed as previously described<sup>33</sup>, using a multiplicity of infection of 100 plaque forming units (pfu)/cell. At 1h post-inoculation, cells were washed 3 times with PBS and cultured until the time of the analysis. All preparations were tested for the absence of endotoxin (Lonza Verviers, Belgium)

### ***Cell stimulation***

Cells ( $10^6$  per well) were stimulated with TLR agonists (Invivogen) and harvested after 6 hr (except for RIGI/MDA5 after 24 hr) for the analysis of IL-6 protein production by ELISA : TLR1/2 (Pam3CSK4, 0.8µg/ml), TLR3 (Poly(I:C), 10µg/ml), TLR4 (LPS 0.4µg/ml), TLR5 (Flagellin, 0.1µg/ml), TLR6 (FSL-1, 0.1µg/ml), TLR7/8 (ssRNA, 10µg/ml), RIGI/MDA5 (transfection of Poly(I:C) with the reagent Iyovec, 0.2µg/ml). For the cytokine gene expression analysis following poly(I:C) stimulation, cells were harvested after 3 hr of stimulation.

### ***RNA purification and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction***

Total RNA were purified with the Nucleospin RNA II kit according to the manufacturer's protocol (Macherey Nagel). cDNA was obtained after reverse transcription using the SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life technologies) and real time quantitative qPCR (the sequence of primer pairs were listed in Supplementary **Table 1**) was performed using the EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR Supermix Universal, according to the manufacturer's

instructions (Life technologies), and run on the MyiQ Biorad machine. Relative mRNA expression was analyzed with q-base software (Biogazelle, Belgium) using the comparative cycle threshold ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method with 2 housekeeping genes (RPLP0 and  $\beta$ -actin) previously tested for their stability in the HepaRG cells and the PHH, and normalized to the control conditions (=1). The relative HBV mRNA level was quantified using the same primer pairs used for the HBV PCR quantification.

#### ***Analysis of cytokine production***

At selected time points, cell culture supernatant were harvested and tested for the secretion of IL-6 (R&D system), IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  (PBL Interferon Source) according to the manufacturer's instructions.

#### ***UV inactivation***

Prior to infection, HBV and mock inocula were irradiated or not at room temperature on a UV Transilluminator (Appligene) delivering 3.3 mw/cm<sup>2</sup> for 30, 60, or 90 min. The efficacy of HBV replication with UV-inactivated inocula was analyzed after exposure to HepaRG cells by RT-qPCR and secretions of HBeAg and HBsAg were analyzed by ELISA (**Fig. S4**).

#### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was performed using the Dixon and the nonparametric Mann-Whitney tests using the GraphPad Prism software. For all tests, a p value  $\leq 0.05$  (\*) was considered as significant.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Lydie Lefrançois and Judith Fresquet for the isolation of primary human hepatocytes, as well as the staff from Pr Michel Rivoire's surgery room for providing us with liver resection. We are grateful to William Mason (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA) and Romain Parent (CRCL, INSERM, Lyon France) for the critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from ANRS (French national agency for research on AIDS and viral hepatitis), FINOVI (Foundation for innovation in infectiology), FRM (Foundation for medical research; DEQ20110421327), Hoffmann-La-Roche (U.S.A. division; please note that only the INSERM laboratory was supported by this grant, IARC did not received any funds) and by INSERM core grants. This work was also supported by the DEVweCAN LABEX (ANR-10-LABX-0061) of the "Université de Lyon", within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR).

## References

1. Arzumanyan A, Reis HM, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2013;13:123-35.
2. Bertolotti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut* 2012;61:1754-64.
3. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol* 2008;48:335-52.
4. Kennedy PT, Sandalova E, Jo J, Gill U, Ushiro-Lumb I, Tan AT, Naik S, Foster GR, Bertolotti A. Preserved T-cell function in children and young adults with immune-tolerant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2012;143:637-45.
5. Zoulim F. Are novel combination therapies needed for chronic hepatitis B? *Antiviral Res* 2012;96:256-9.
6. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2008;89:1-47.
7. Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut* 2012;61 Suppl 1:i6-17.
8. Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2008;8:911-22.
9. Manel N, Littman DR. Hiding in plain sight: how HIV evades innate immune responses. *Cell* 2011;147:271-4.
10. Li K, Lemon SM. Innate immune responses in hepatitis C virus infection. *Semin Immunopathol* 2013;35:53-72.

- 531 11. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity:  
532 update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84.
- 533 12. Durantel D, Zoulim F. Innate response to hepatitis B virus infection: observations  
534 challenging the concept of a stealth virus. *Hepatology* 2009;50:1692-5.
- 535 13. Ait-Goughoulte M, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. Innate antiviral immune  
536 responses to hepatitis B virus. *Viruses* 2010;2:1394-410.
- 537 14. Dandri M, Lutgehetmann M, Petersen J. Experimental models and therapeutic  
538 approaches for HBV. *Semin Immunopathol* 2013;35:7-21.
- 539 15. Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, Lebedeva M, DeCamp  
540 A, Li D, Grove D, Self SG, Borrow P. Induction of a striking systemic cytokine cascade  
541 prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in  
542 contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus  
543 infections. *J Virol* 2009;83:3719-33.
- 544 16. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response  
545 to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6669-74.
- 546 17. Fletcher SP, Chin DJ, Ji Y, Iniguez AL, Taillon B, Swinney DC, Ravindran P, Cheng DT,  
547 Bitter H, Lopatin U, Ma H, Klumpp K, Menne S. Transcriptomic analysis of the  
548 woodchuck model of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2012;56:820-30.
- 549 18. Dunn C, Peppas D, Khanna P, Nebbia G, Jones M, Brendish N, Lascar RM, Brown D,  
550 Gilson RJ, Tedder RJ, Dusheiko GM, Jacobs M, Klenerman P, Maini MK. Temporal  
551 analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection.  
552 *Gastroenterology* 2009;137:1289-300.
- 553 19. Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol*  
554 2005;79:9369-80.



- 555 20. Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, Rodgers S,  
556 Kurtovic J, Chang J, Lewin S, Desmond P, Locarnini S. Regulation of Toll-like receptor-  
557 2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* 2007;45:102-  
558 10.
- 559 21. Lang T, Lo C, Skinner N, Locarnini S, Visvanathan K, Mansell A. The hepatitis B e  
560 antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling  
561 pathway. *J Hepatol* 2011;55:762-9.
- 562 22. Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Sowa JP, Dittmer U,  
563 Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. Hepatitis B virus suppresses toll-  
564 like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and  
565 nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 2009;49:1132-40.
- 566 23. Christen V, Duong F, Bernsmeier C, Sun D, Nassal M, Heim MH. Inhibition of alpha  
567 interferon signaling by hepatitis B virus. *J Virol* 2007;81:159-65.
- 568 24. Lutgehetmann M, Bornscheuer T, Volz T, Allweiss L, Bockmann JH, Pollok JM, Lohse  
569 AW, Petersen J, Dandri M. Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to  
570 interferon-alpha in chimeric mice. *Gastroenterology* 2011;140:2074-83, 2083 e1-2.
- 571 25. Tsuge M, Takahashi S, Hiraga N, Fujimoto Y, Zhang Y, Mitsui F, Abe H, Kawaoka T,  
572 Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Effects of hepatitis B virus infection on  
573 the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice. *J*  
574 *Infect Dis* 2011;204:224-8.
- 575 26. Twu JS, Lee CH, Lin PM, Schloemer RH. Hepatitis B virus suppresses expression of  
576 human beta-interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:252-6.

- 577 27. Fernandez M, Quiroga JA, Carreno V. Hepatitis B virus downregulates the human  
578 interferon-inducible MxA promoter through direct interaction of precore/core  
579 proteins. *J Gen Virol* 2003;84:2073-82.
- 580 28. Hosel M, Quasdorff M, Wiegmann K, Webb D, Zedler U, Broxtermann M,  
581 Tedjokusumo R, Esser K, Arzberger S, Kirschning CJ, Langenkamp A, Falk C, Buning H,  
582 Rose-John S, Protzer U. Not interferon, but interleukin-6 controls early gene  
583 expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2009;50:1773-82.
- 584 29. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo  
585 C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.  
586 *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15655-60.
- 587 30. Parent R, Marion MJ, Furio L, Trepo C, Petit MA. Origin and characterization of a  
588 human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 2004;126:1147-56.
- 589 31. Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F. Persistence of  
590 the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like  
591 cells. *J Gen Virol* 2009;90:127-35.
- 592 32. Lucifora J, Durantel D, Testoni B, Hantz O, Levrero M, Zoulim F. Control of hepatitis B  
593 virus replication by innate response of HepaRG cells. *Hepatology* 2010;51:63-72.
- 594 33. Lucifora J, Durantel D, Belloni L, Barraud L, Villet S, Vincent IE, Margeridon-Thermet S,  
595 Hantz O, Kay A, Levrero M, Zoulim F. Initiation of hepatitis B virus genome replication  
596 and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel  
597 recombinant baculovirus vector. *J Gen Virol* 2008;89:1819-28.
- 598 34. Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res*  
599 2008;134:235-49.

- 600 35. Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves  
601 mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate  
602 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17717-22.
- 603 36. Schadler S, Hildt E. HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses* 2009;1:185-209.
- 604 37. Pasquetto V, Wieland SF, Uprichard SL, Tripodi M, Chisari FV. Cytokine-sensitive  
605 replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures. *J Virol*  
606 2002;76:5646-53.
- 607 38. Oquendo J, Dubanchet S, Capel F, Mabit H, Petit MA. Suppressive effect of hepatitis B  
608 virus on the induction of interleukin-1 beta and interleukin-6 gene expression in the  
609 THP-1 human monocytic cell line. *Eur Cytokine Netw* 1996;7:793-800.
- 610 39. Oquendo J, Karray S, Galanaud P, Petit MA. Effect of hepatitis B virus on tumour  
611 necrosis factor (TNF alpha) gene expression in human THP-1 monocytic and Namalwa  
612 B-cell lines. *Res Immunol* 1997;148:399-409.
- 613 40. Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch  
614 CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells  
615 leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune  
616 escape. *Immunology* 2003;109:487-95.
- 617 41. Op den Brouw ML, Binda RS, van Roosmalen MH, Protzer U, Janssen HL, van der  
618 Molen RG, Woltman AM. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic  
619 cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology*  
620 2009;126:280-9.
- 621 42. Xu Y, Hu Y, Shi B, Zhang X, Wang J, Zhang Z, Shen F, Zhang Q, Sun S, Yuan Z. HBsAg  
622 inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic  
623 cells. *Mol Immunol* 2009;46:2640-6.

624 43. Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis  
625 HL. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG  
626 motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:12631-6.

627 44. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, Norder H, Protzer U, Hainaut P, Zoulim F,  
628 Tommasino M, Trepo C, Hasan U, Chemin I. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression  
629 and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 2011;6:e26315.

630 45. Vanlandschoot P, Van Houtte F, Roobrouck A, Farhoudi A, Leroux-Roels G. Hepatitis B  
631 virus surface antigen suppresses the activation of monocytes through interaction  
632 with a serum protein and a monocyte-specific receptor. *J Gen Virol* 2002;83:1281-9.

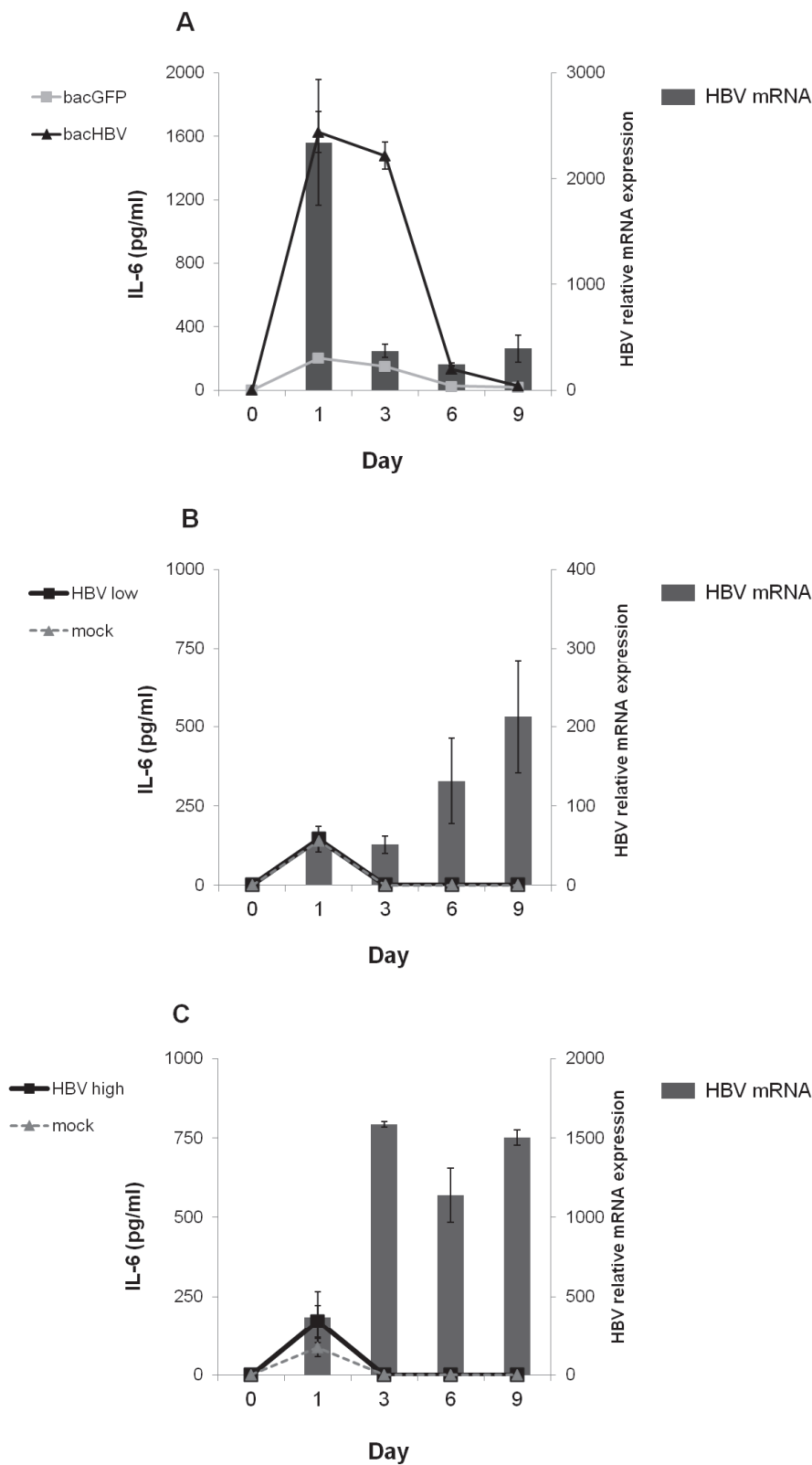
633 46. Vanlandschoot P, Van Houtte F, Roobrouck A, Farhoudi A, Stelter F, Peterson DL,  
634 Gomez-Gutierrez J, Gavilanes F, Leroux-Roels G. LPS-binding protein and CD14-  
635 dependent attachment of hepatitis B surface antigen to monocytes is determined by  
636 the phospholipid moiety of the particles. *J Gen Virol* 2002;83:2279-89.

637 47. Lecluyse EL, Alexandre E. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected  
638 human liver tissue. *Methods Mol Biol* 2010;640:57-82.

639

640

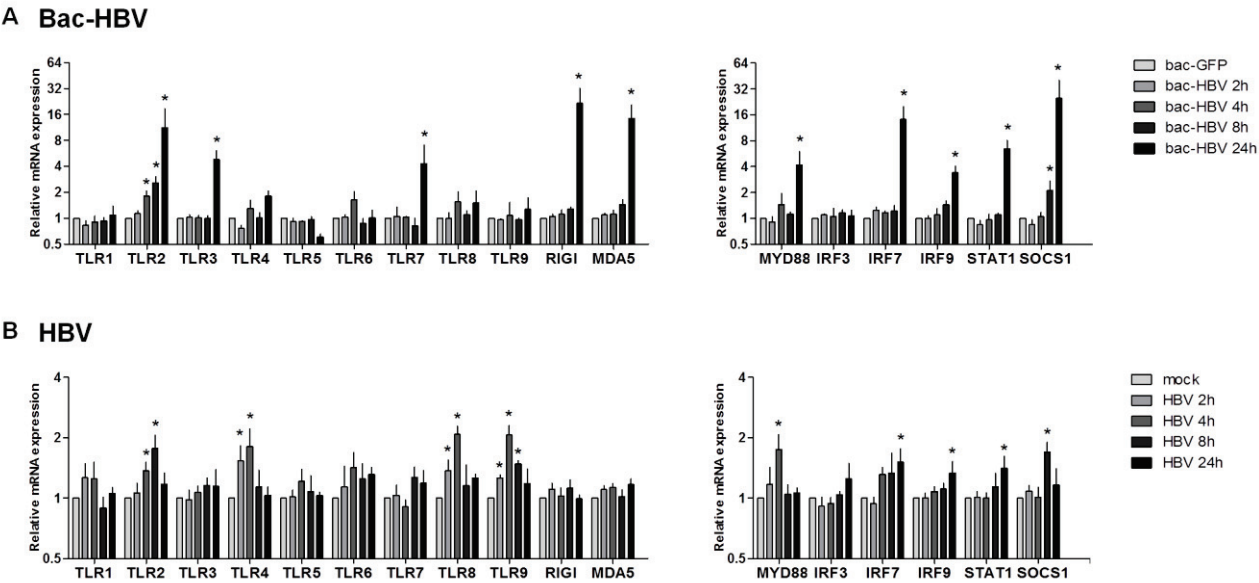
642                                   **Figure 1.**



**Figure 1. Kinetics of HBV replication and IL-6 secretion in HepaRG cells after Bac-HBV transduction or HBV infection.** (A) HepaRG cells were either transduced with Bac-HBV or infected with 2 different doses of HBV, (B) low (100 vge/cell) or (C) high (1000 vge/cell). Cell supernatants were harvested at the indicated time point to measure IL-6 protein secretion (left axis) and compared to the control media (Bac-GFP or mock). The relative HBV mRNA expression in these cells was quantified in parallel by RT-qPCR (right axis). Results are represented as the mean  $\pm$  SD of one representative experiment.

652

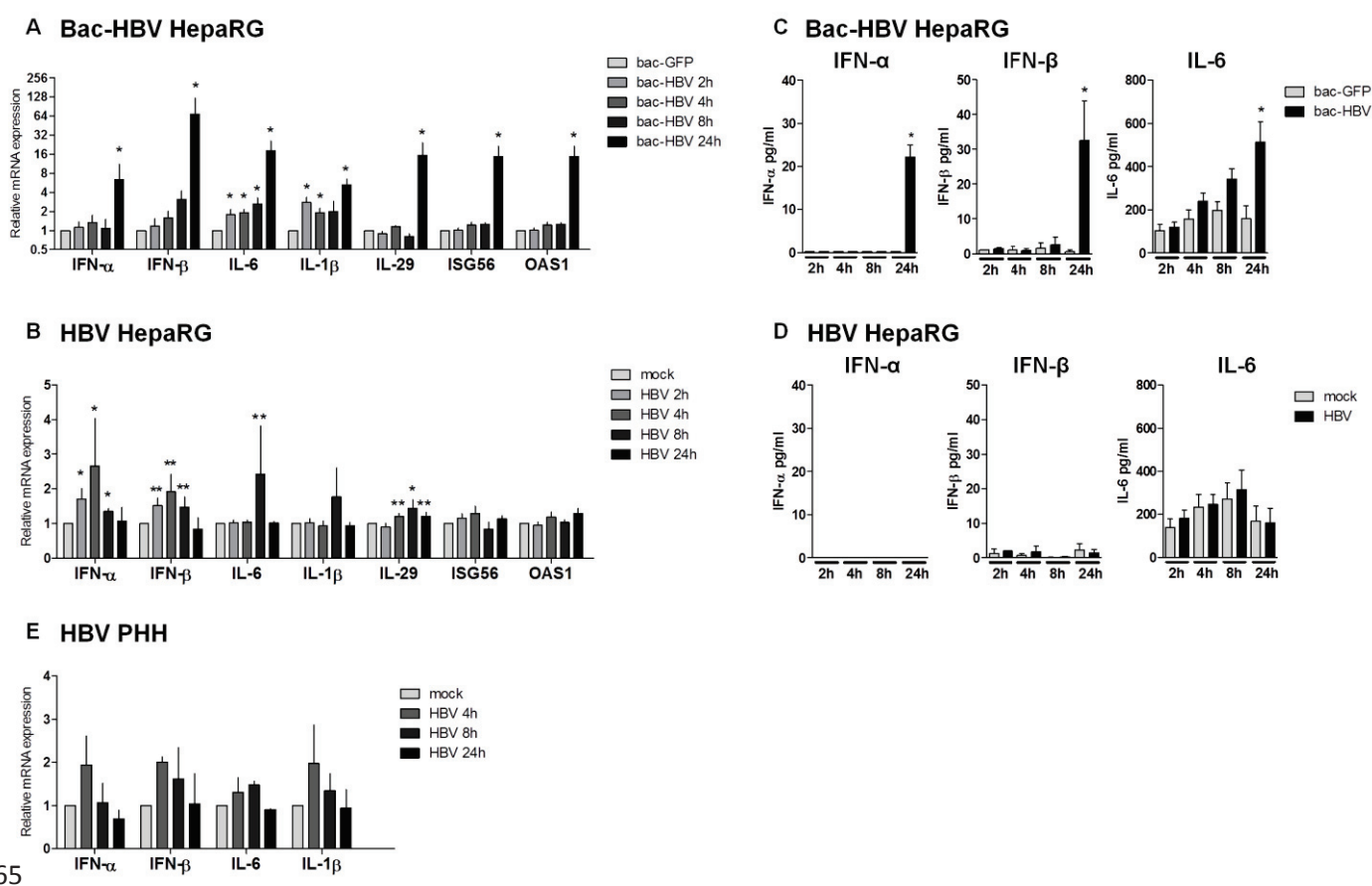
Figure 2.



653

654 **Figure 2. Kinetics of the relative mRNA expression of pathogen recognition receptors**  
655 **(PRRs) and intracellular signaling mediators after Bac-HBV transduction or HBV infection in**  
656 **HepaRG cells.** (A) Bac-HBV transduced cells and (B) HBV infected cells were harvested at the  
657 indicated time point (2, 4, 8 or 24 hr) after cells transduction or infection. The fold induction  
658 of the relative mRNA expression level of the PRR (left panel) or the signaling pathways  
659 intermediates (right panel) was normalized to housekeeping genes and compared to either  
660 Bac-GFP or mock controls (=1). Results are given as a mean  $\pm$  sem of at least 3 independent  
661 experiments (n=3-4) and differences were considered as statistically significant to the  
662 control conditions when the p value was  $\leq 0.05$  (\*).

663



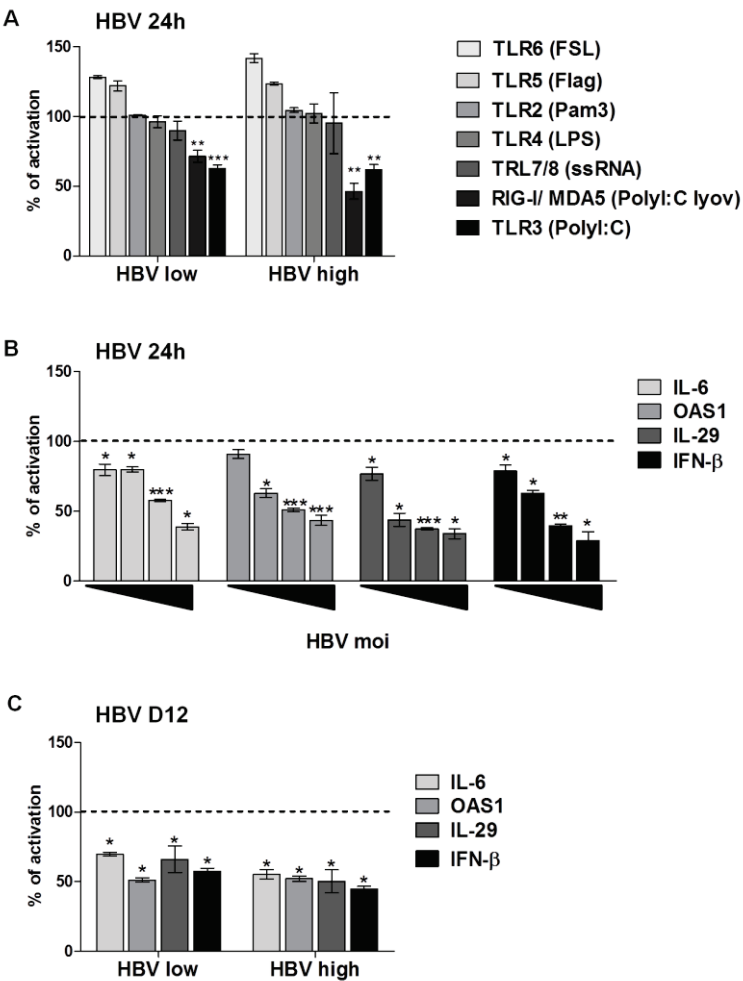
665

666 **Figure 3. Kinetics of the relative mRNA expression of cytokine and interferon stimulated**  
 667 **gene after Bac-HBV transduction or HBV infection in human hepatocytes.** Bac-HBV  
 668 transduced cells (A and C) and HBV infected HepaRG cells (B and D) or HBV infected primary  
 669 human hepatocytes (PHHs) (E) were harvested at the indicated time points (2, 4, 8, or 24 hr)  
 670 after transduction or infection. The fold induction of the relative mRNA expression level of  
 671 the cytokines (A, B and E) was normalized to housekeeping genes and compared to either  
 672 Bac-GFP or mock controls (=1). The supernatants from these cells were also harvested at the  
 673 indicated time point to measure the secreted proteins and compared to the control media  
 674 (Bac-GFP or mock) (C and D). Results are given as a mean  $\pm$  sem of at least 3 independent  
 675 experiments (n=3-7) and differences were considered as statistically significant to the  
 676 control conditions (Bac-GFP or mock) when the p value was  $\leq 0.05$  (\*),  $\leq 0.005$  (\*\*). The  
 677 results for the relative mRNA expression for PHH are given as a mean  $\pm$  SD of 2 independent  
 678 experiments.

679



Figure 4.

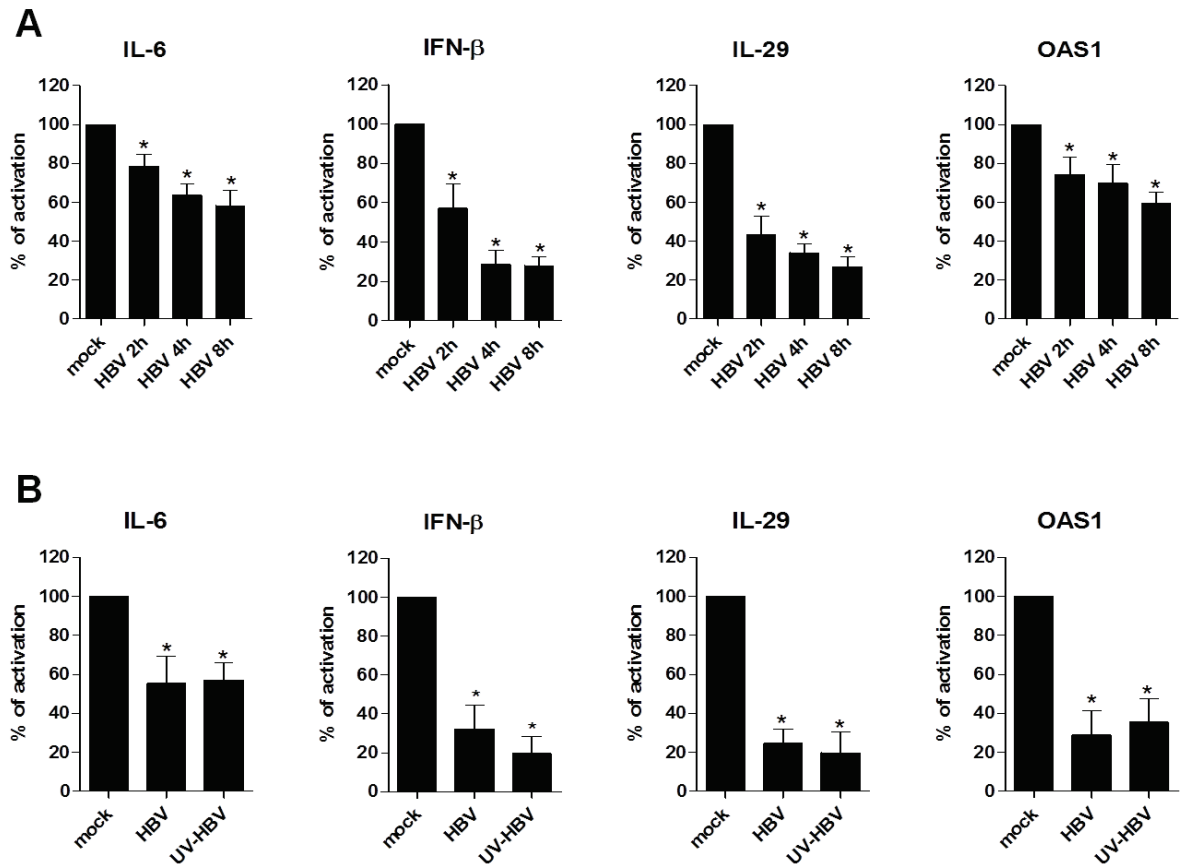


681

682 **Figure 4. Cytokine expression following the stimulation of pathogen recognition receptors**  
683 **in HBV-infected HepaRG cells.** The induction of the innate response was first evaluated  
684 through (A) IL-6 secretion in cells infected with HBV (low =100 vge/cell, high =1000 vge/cell)  
685 for 24 hr and after cell stimulation by several PRR agonists as indicated in the experimental  
686 procedure section. (B) The induction of the relative innate gene expression level in poly(I:C)  
687 stimulated cells was analyzed by RT-qPCR in HepaRG cells infected for 24h with increasing  
688 amount of virus (1-10-100-1000 vge/cell), (C) or after 12 days of infection (100-1000  
689 vge/cell). The mRNA expression level for each gene was normalized to housekeeping genes  
690 and relatively compared to the control mock-infected cells. The percentage of activation of  
691 each gene was then compared to the stimulated control mock-infected cells ( =100%).  
692 Results are given as a mean  $\pm$  sem of at least 3 independent experiments (n=3-15) and  
693 differences were considered as statistically significant to the control condition when the p  
694 value was  $\leq 0.05$  (\*),  $\leq 0.005$  (\*\*),  $\leq 0.0005$  (\*\*\*)).

695

Figure 5.



697

698

699

700

701

702

703

704

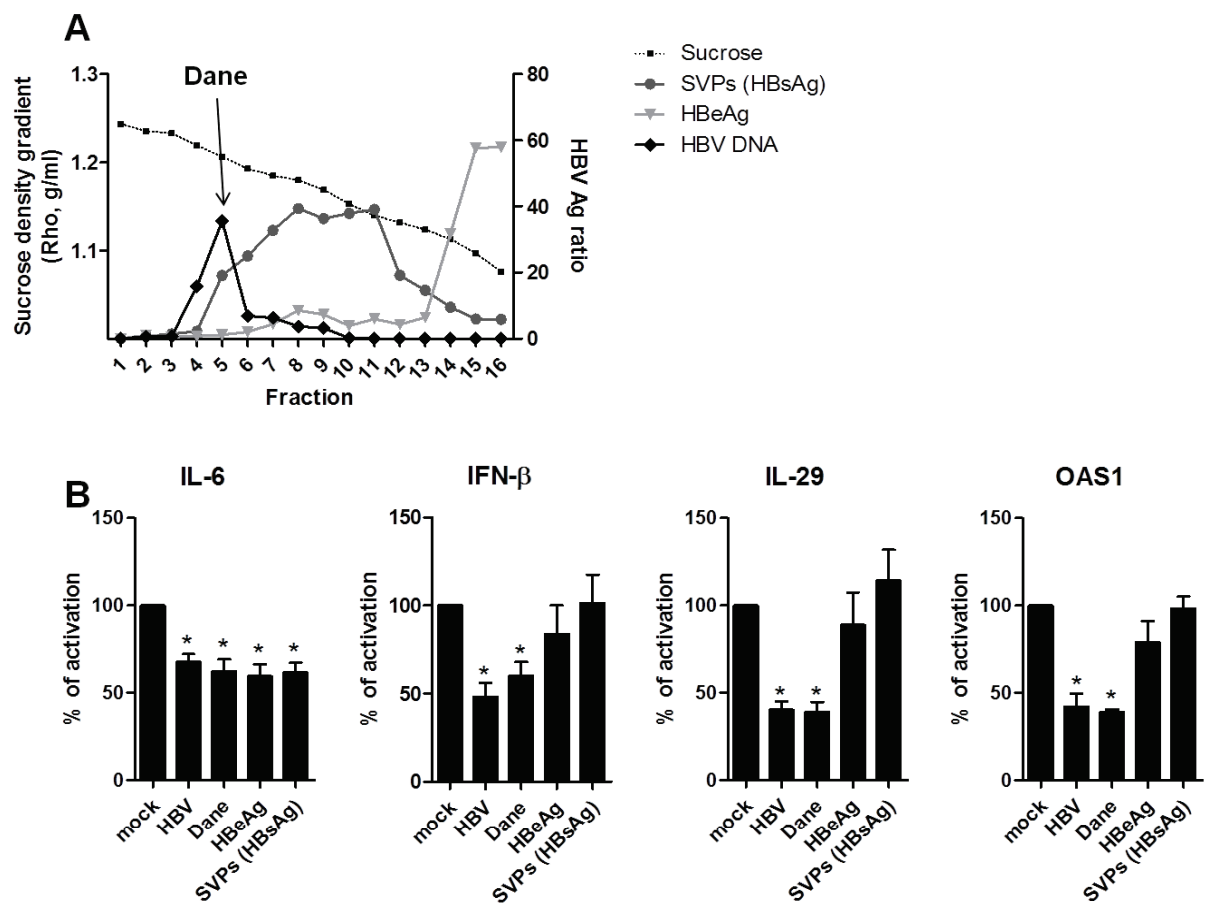
705

706

707

**Figure 5. Inhibition of the hepatocytes innate immune response by HBV is a very early event.** (A) HepaRG cells were infected with HBV (100 vge/cell) for 2-4 or 8hr and then stimulated by poly(I:C). (B) Cells were also infected (100 vge/cell) with a non-UV (HBV) or UV-inactivated virus (UV-HBV) for 24 hr and stimulated with poly(I:C). The mRNA expression level for each gene was normalized to housekeeping genes and relatively compared to the control mock-infected cells. The percentage of activation of each gene was then compared to the stimulated mock or UV-mock controls (=100%). Results are given as a mean ± sem of 3 independent experiments and differences were considered as statistically significant to the control condition when p value was ≤0.05 (\*).

Figure 6.

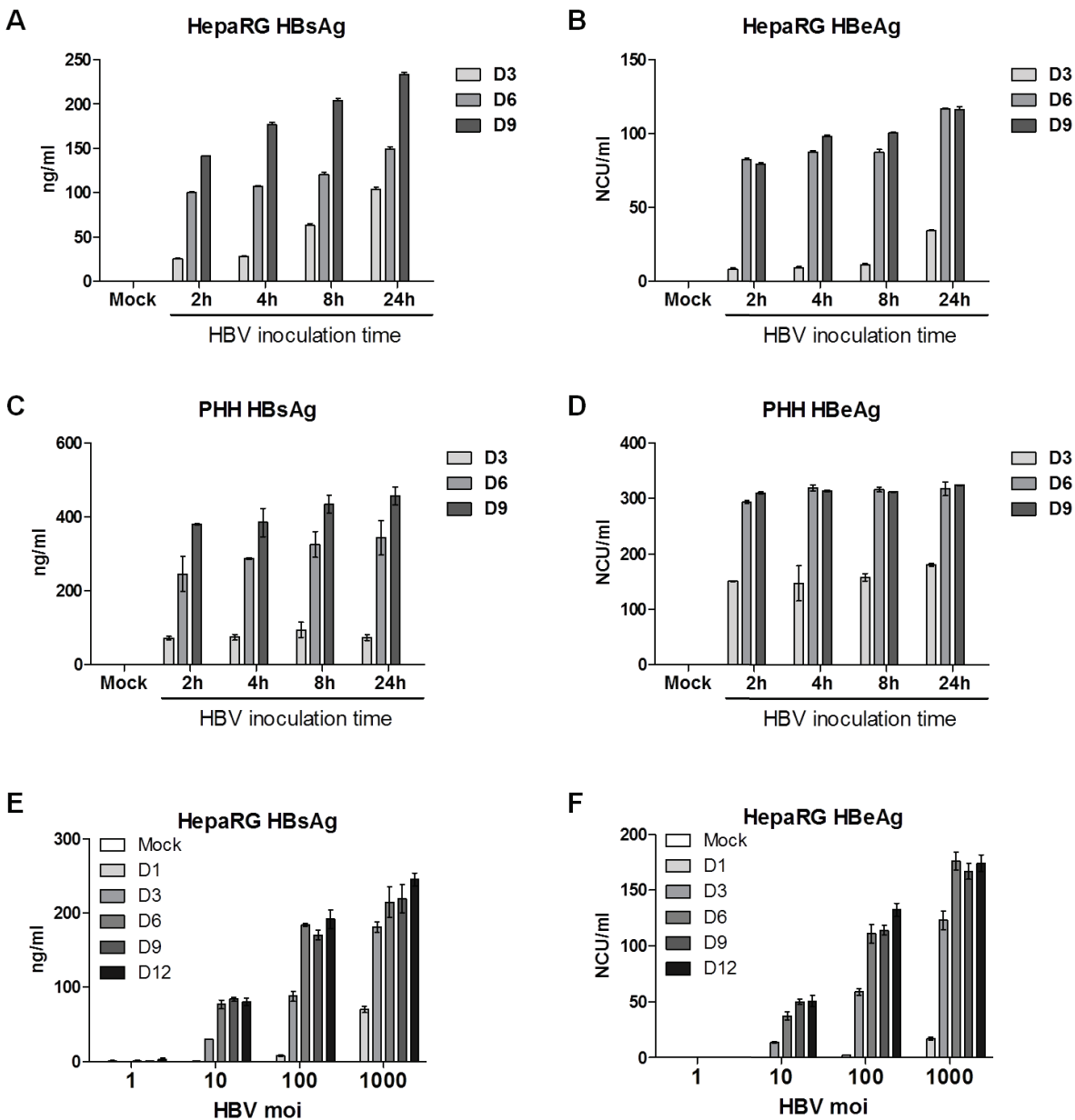


709

710 **Figure 6. The inhibition of the dsRNA sensors-mediated cytokine expression is mediated by**  
711 **HBV proteins of the viral inoculum.** (A) HBV infectious particles (Dane particles), subviral  
712 particles SVPs (HBsAg) and HBeAg were purified through a sucrose gradient as described in  
713 the experimental procedure section. The purity of each fraction was tested by qPCR (for the  
714 Dane particles) and by immunoassay for the HBsAg and HBeAg (left axis) and the linearity of  
715 the sucrose gradient was also shown on the graph (right axis). (B) HepaRG cells were  
716 exposed for 24 hr with the whole HBV inoculum (100 vge/cell) or with the same amount of  
717 infectious virion (Dane) (100 vge/cell), HBeAg (4.4 NCU/10<sup>6</sup> cells) and SVPs (HBsAg) (5 ng/10<sup>6</sup>  
718 cells) purified from the sucrose gradient. Cells were then stimulated by poly(I:C) and RT-  
719 qPCR were performed to analyze the induction of the hepatocyte innate response. The  
720 mRNA expression level for each gene was normalized to housekeeping genes and relatively  
721 compared to the control mock-infected cells. The percentage of activation of each gene was  
722 then compared to the stimulated control mock-infected cells (=100%). Results are given as a

mean  $\pm$  sem of at least 3 independent experiments (n=3-6) and differences were considered as statistically significant to the control condition when p value was  $\leq 0.05$  (\*).

Figure S1

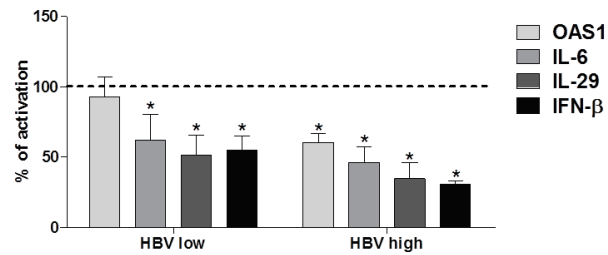


**Kinetics of HBV replication in HepaRG cells and primary human hepatocytes (PHH)**

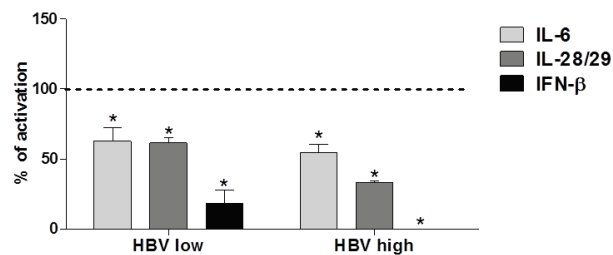
(A-D) Cells were infected with HBV (100 vge/cell) for 2, 4, 8 and 24 hr or (E- F) infected with increasing amount of virus (1-10-100-1000 vge/ml) for 24 hr. (A-B, E-F) The secretion of HBsAg and HBeAg was measured by immunoassay 3, 6 and 9 days post infection in the HepaRG cells and (C-D) in PHHs. Results are given as a mean  $\pm$  SD of one representative experiment.

Figure S2

### A Gene expression



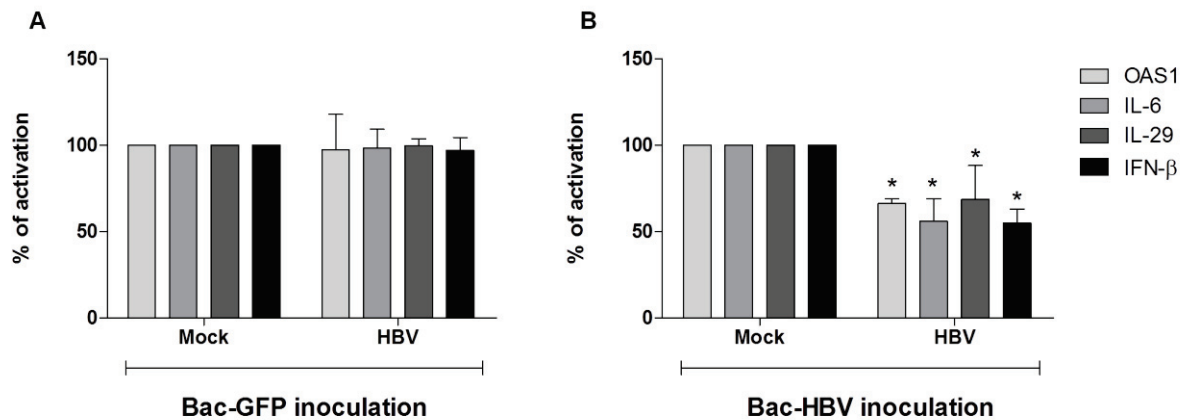
### B Protein secretion



**Induction of cytokine gene expression and protein secretion in HBV infected primary human hepatocytes (PHH) following Poly(I:C) stimulation.** PHHs were infected for 24 hr with HBV (low =100 vge/cell, high =1000 vge/cell) and then stimulated with poly(I:C). The induction of the innate response was first evaluated through (A) the induction of the relative gene expression level of several cytokines (IL-6, IL-29, IFN-β) and ISG (OAS1) and the protein secretion of IL-6 and IFNλ by ELISA (R&D system) and type I IFNs measured by Luciferase assay using Huh7.5 cells transfected with a pISRE-Luc vector (see protocol below). The mRNA expression level for each gene was normalized to housekeeping genes and relatively compared to the control mock-infected cells. The percentage of activation of each gene was then compared to the stimulated control mock-infected cells (=100%). Results are given as a mean ± sem of at least 3 independent experiments (n=3-6) and differences were considered as statistically significant to the control condition when p value was ≤0.05 (\*).

**Analyses of secreted Type I Interferon.**  $2.10^6$  Huh7.5 cells were transfected with 10 μg pISRE-Luc vector (Stratagene) in a 10 cm diameter dish using Mirus TransIT-LT1 transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Mirus Bio LLC). The pISRE-Luc plasmid (plasmid containing the luciferase gene under the control of the Interferon Stimulated Response Element) expressed luciferase under type I IFN inducible promoter. After 16 hr of incubation with the transfection mixture, cells were trypsinized and reseeded in a 96-well plate at  $\sim 3.10^4$  cells/well in a volume of 50 μl. Six hours later, 50 μl of conditioned medium were added to the wells and incubated for 24 hr at 37°C. Cells were then washed with PBS and lysed before luciferase activity was monitored using the Renilla Luciferase Assay System (Promega).

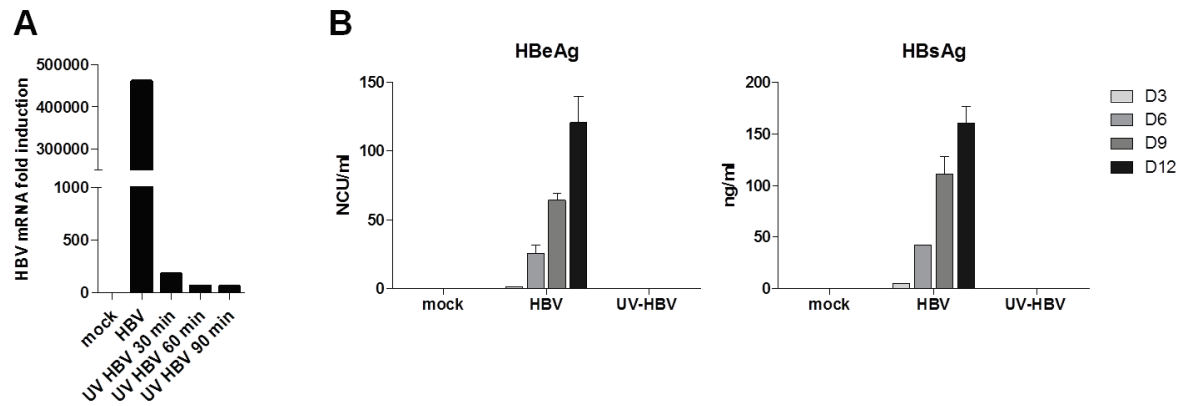
Figure S3.



### HBV could repress the innate response triggered by a super-transduction with Bac-HBV in HepaRG cells.

HepaRG cells were infected for 24 hr with HBV (1000 vge/ml) or a control mock and then transduced with either (A) Bac-GFP or (B) Bac-HBV. The induction of the innate response was evaluated through the induction of the relative gene expression level of several cytokines (IL-6, IL-29, IFN-β) and ISG (OAS1). (A) No significant modulation of the cytokine relative mRNA expression level was detected between mock- and HBV-infected cells and following Bac-GFP transduction in these cells. (B) The inhibition of the innate response was observed only in HBV infected cells following Bac-HBV transduction. The relative mRNA expression level for each gene was normalized to housekeeping genes and relatively compared to the control mock-infected cells. The percentage of activation of each gene was then compared to the control mock-infected cells (=100%) 24 hr following Bac-GFP or Bac-HBV transduction. Results are given as a mean ± sem of at least 3 independent experiments (n=3-4) and differences were considered as statistically significant to the control condition when p value was ≤0.05 (\*).

**Figure S4**



**HBV, but not UV-treated HBV replicates in HepaRG cells**

HBV/ mock inoculum was irradiated or not for 30, 60 and 90 min and HepaRG cells were incubated for 24 hr with either the non-UV HBV or the UV-inactivated HBV (UV-HBV) inoculum. (A) The mRNA level of HBV was measured by RT-qPCR 12 days post-infection to follow the effect of the UV-inactivation on the virus replication. (B) The secretion of HBeAg and HBsAg was monitored from day 3 to day 12 post-infection in the HBV or UV- HBV infected cells and results were given as a mean  $\pm$  SD of one representative experiment.



815

Table S1.

816

	Forward	Reverse
TLR1	CAGGCCCTCTTCCTCGTTAGA	TTCCTAAAGGTAGAAGCTGTTCTTCA
TLR2	CTCTCGGTGTCGGAAT	CCCGCTCACTGTAAGAA
TLR3	TTTGCGAAGAGGAATGTTTAAATCT	CACCTATCCGTTCTTTCTGAACTG
TLR4	TCTTGGTGGAAAGTTGAACG	GCCACACCGGGAATAA
TLR5	GTACCCTGACTCGTTCT	TTCTGCACCCATGTGA
TLR6	AGTGGACCCAGACTCG	AGTTCGTAATGGCACC
TLR7	GATTGAAACCTGACCAATTTGCT	AAATACGACATCGCCAATCTAAGG
TLR8	TGAGCTGCGCTACCAC	CTTCTGCCTTCGGGTT
TLR9	GGCCCCCGGCTTCTT	CAGGAGTGGTCCACTGTCTTGA
RIGI	GCTGATGAAGGCATTGACATTG	CAGCATTACTAGTCAGAAGGAAGCA
MDA5	CCCATGACACAGAATGAACAAAA	CGAGACCATAACGGATAACAATGT
MYD88	GCGGGCATCACCACACTT	TCCGGCGGCACCTCTTTT
IRF3	ACCAGCCGTGGACCAAGAG	TACCAAGGCCCTGAGGCAC
IRF7	TGGTCCTGGTGAAGCTGGAA	GATGTCGTCATAGAGGCTGTTGG
IRF9	CCCGAAAACCTCCGGAACCTG	CAGCACACTCCGGGAAACT
STAT1	GTGGAAAGACAGCCCTGCAT	ACTGGACCCCTGTCTTCAAGAC
SOCS1	GACGCCTGCGGATTCTACTG	GGCCATCTTCACGCTAAGGG
IFN- $\alpha$	GTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCAC	TCTCATGATTTCTGCTCTGACAA
IFN- $\beta$	GCCGCATTGACCATGTATGAGA	GAGATCTTCAGTTTCGGAGGTAAC
IL-29	GTGGTGCTGGTGACTTTGG	CTCCTGTGGTGACAGAGATTTG
IL-6	ACCCCTGACCCAACCACAAAT	AGCTGCGCAGAATGAGATGAGTT
IL1- $\beta$	AATCTGTACCTGTCCTGCGTGTT	TGGGTAATTTTGGGATCTACACTCT
ISG56	AGCCAACATGTCCTCACAGAC	CTTCTACCACTCGTTTCATGC
OAS1	AGGTGGTAAAGGGTGGCTCC	ACAACCAGGTCAGCGTCAGAT
b-ACTIN	TGGCATTGCCGACAGGATGC	TCTGCTGGAGGTGGACAGCGA
RPLP0	CACCATTGAAATCCTGAGTGATGT	TGACCAGCCCAAAGGAGAAG

817

818 Sequences of Human primer pairs used for RT-qPCR

819

## Etude 3

**Virion-associated Hepatitis B core (HBc) protein is a very early negative regulator of the IFN response**

(Manuscrit en préparation)

**Marion Gruffaz**, Barbara Testoni\*, Souphalone Luangsay\*, Floriane Fusil, Malika Ait-Goughoulte, Jimmy Mancip, Marie Anne Petit, Hassan Javanbakht, Klaus Klumpp, Francois-Loic Cosset, Fabien Zoulim¶, and David Durantel¶

*\*contributed equally, ¶contributed equally*



## Virion-associated Hepatitis B core (HBc) protein is a very early negative regulator of the IFN response

Marion Gruffaz<sup>1,2</sup>, Barbara Testoni<sup>1,2\*</sup>, Souphalone Luangsay<sup>1,2\*</sup>, Floriane Fusil<sup>3</sup>, Malika Ait-Goughoulte<sup>1,2</sup>, Jimmy Mancip<sup>3</sup>, Marie Anne Petit<sup>1,2</sup>, Hassan Javanbakht<sup>4</sup>, Klaus Klumpp<sup>4</sup>, François-Loïc Cosset<sup>3</sup>, Fabien Zoulim<sup>1,2,4,5,¶</sup>, and David Durantel<sup>1,2¶</sup>

1. INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie (CRCL), Lyon, 69008, France

2. Université de Lyon, UMR\_S1052, CRCL, 69008 Lyon, France

3. INSERM U1111, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), 69007 Lyon, France

4. Hoffmann-La Roche Inc, Nutley, NJ 07110, USA

5. Hospices Civils de Lyon (HCL), 69002 Lyon, France

6. Institut Universitaire de France (IUF), 75005 Paris, France

\*contributed equally, ¶contributed equally,

### Correspondence:

david.durantel@inserm.fr

fabien.zoulim@inserm.fr

Phone: + 33 4 72 68 19 70

Fax : +33 4 72 68 19 71

### Running Title

HBc is a very early negative regulator of IFN response

### Highlights

- HBc is the viral protein involved in the very early inhibition of IFN response
- There is no need for *de novo* synthesis of HBc to mediate the effect, as virion-associated HBc can, after HBV entry, nucleocapsid migration to the nucleus and HBc translocation into it, induce the inhibitory effect
- HBc bind to target promoters, and recruit histone methyltransferases to induce epigenetic repressive marks leading to impairment of gene inducibility
- First demonstration that a viral structural protein present in virions can modulate gene expression shortly after viral entry

## Summary

HBV, as many other viruses, has evolved different strategies to evade immune responses to establish and maintain viral persistence. In particular HBV does not seem to induce any IFN and pro-inflammatory responses during acute infection. This lack of induction could be due to a lack of detection by innate sensors or result from an active evasion via the prompt establishment of inhibitory mechanisms.

In a previous work, we have shown that HBV virions contained a factor, which was involved in the very early inhibition of IFN response immediately after infection. Here we demonstrate that HBc is the viral protein involved in this inhibitory process. After HBV entry, nucleocapsids migrate towards the nucleus and HBc translocates into this compartment, where it can interact with the promoters of some innate genes to impair their inducibility upon dsRNA sensors engagement. Promoter-bound-HBc recruits histone methyltransferases, Ezh2 and G9a, which are responsible for the establishment of epigenetic repressive marks on these genes.

HBV has originally evolved a strategy to block IFN response immediately after the onset of infection; this strategy does not need *de novo* viral synthesis in neo-infected cells, as it is based on the structural virion-associated HBc protein, which constitutes nucleocapsid.

## Introduction

Around 400 millions of individuals are chronically infected with hepatotropic viruses and present, if left untreated, an increased risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Arzumanyan et al., 2013; El-Serag, 2012). Hepatitis B virus (HBV), a DNA virus belonging to the *Hepadnaviridae* family, is highly endemic in some area of the globe, whereas sporadic in others, and altogether chronically infects around 250 million individuals worldwide (WHO Hepatitis B, Fact sheet N°204, July 2012). The natural history of HBV infection is rather complex with a succession of different physiopathologic phases, including the so-called immune-tolerance phase, a chronic-active-hepatitis (CAH) phase, an inactive-carrier phase, and potential reactivation episodes (Fattovich et al., 2008; McMahon, 2010). During the immune tolerance phase of chronic HBV infection, the virus replicates at very high levels without immune control. To establish chronic infection and maintain it for years/decades, HBV has evolved many strategies to evade host innate and adaptive immune responses (Ait-Goughoulte et al., 2010; Bertoletti and Ferrari, 2012; Dandri and Locarnini, 2012). To break this immune-tolerance and restore immune control of the virus, virus-mediated inhibitory mechanisms would have to be defeated/unlocked in an interventional therapeutic perspective. To this end, a better knowledge of the underlying molecular mechanisms responsible for virus-induced blockades of immune responses is crucial before envisaging such strategies. Many HBV proteins, including proteins expressed within infected hepatocytes (HBx, HBV polymerase...) or bloodstream secreted antigens (HBsAg and HBeAg) have been shown to bear immuno-modulatory functions either within infected hepatocytes, in the liver micro-environment by inhibiting innate immune cell functions and cross-talks (eg. Kupffer cells, pDC, NK...), or systemically (Ait-Goughoulte et al., 2010; Bertoletti and Ferrari, 2012; Dandri and Locarnini, 2012).

The interferon response is a central component of host antiviral strategies (de Weerd and Nguyen, 2012; Randall and Goodbourn, 2008; Wang and Fish, 2012). This response, which involves the production of a wide range of IFNs (type I, II and III), may occur within infected cells or in the microenvironment by the activation of professional innate immune cells (i.e. IPC; IFN producing cells such as pDC). This response is crucial to contain the early spreading of viruses, reduce the intensity of their replication, finely tune cellular innate response and enable the orchestration of subsequent adaptive response. In return viruses, in particular those that will progress to chronicity, have evolved strategies to evade this IFN response to

their own benefit (Bowie and Unterholzner, 2008; Heim, 2013; Manel and Littman, 2011; Randall and Goodbourn, 2008). In this respect HBV is an interesting virus, as in contrast to HIV or HCV, it does not seem to induce a measurable systemic production of IFN in the early phase of human infection (Dunn et al., 2009; Stacey et al., 2009). If the results obtained with human samples are subjected to caution, because of the difficulty to get robust and homogeneous cohort of patients in the acute phase of infection to perform analyses, experiments performed in self-resolving HBV-infected chimpanzees have suggested that innate immunity genes were not up-regulated in their liver when HBV viremia was exponentially rising (i.e. few weeks post infection) (Wieland et al., 2004). Since then, HBV had been considered as a “stealth” virus, which does not induce IFN response due to lack of detection by innate sensors (pattern recognition receptors; PRRs) (Wieland et al., 2005). Corroborating this, a close look at the viral life cycle indeed suggests that viral PAMPs (i.e. pathogen associated molecular patterns) are not highly exposed to PRRs (Seeger et al., 2007). But a stealth virus can also be a virus that is able to actively inhibit nascent responses. Substantiating this hypothesis, our recent work, performed *in vitro* in infected primary human hepatocytes or closely related HepaRG cells, has shown that HBV could be detected by PRRs in hepatocytes, but was capable to blunt nascent and in particular dsRNA-mediated IFN response by an active inhibitory mechanism involving a viral component present in HBV virions, but which is not HBsAg or HBeAg (Luangsay et al.). HBc and HBV polymerase are the two other viral proteins present in infectious virions (also called Dane particles), but with a stoichiometry of 240 unit to 1 in favour of HBc, the protein which mainly constitute nucleocapsids (Seeger et al., 2007). A recent study have shown that, in the context of an experimental over-expression, the viral polymerase could inhibit RIGI/MDA5-mediated IFN- $\beta$  induction by interfering with DDX3, a regulating component of the IRF3 kinase complex (Wang and Ryu, 2010). Older studies have also suggested, using reporter systems and non-physiologic HBc expression, that it could inhibit the expression of IFN- $\beta$  and MxA by directly interfering with their transcription (Fernandez et al., 2003; Rosmorduc et al., 1999; Whitten et al., 1991). But, detailed mechanisms about this inhibition remained until now largely unknown.

The aim of this work was to identify the HBV-virion associated factor, which is responsible for the early inhibition of IFN response and to get insights on the molecular mechanism of action. We identified HBV capsid protein (HBc) as the major viral determinant responsible

120 for the very early inhibition of IFN response. We show that HBc plays its role in the nucleus  
121 of neo-infected cells, which suggests that early trafficking of viral nucleocapsids towards the  
122 nucleus and the translocation of HBc into it after uncoating is crucial for the function. We  
123 demonstrate that HBc is capable to specifically bind to promoters of IFN response genes, and  
124 recruits histone methyltransferases, which eventually establish epigenetic repressive marks  
125 on these genes, thus preventing their inducibility upon dsRNA sensors engagement. It is the  
126 first time that a viral structural protein included in virions is shown to modulate gene  
127 expression shortly after viral entry.

128



## Results

### ***HBc is a viral determinant involved in the early inhibition of hepatocyte IFN response***

Recently, we reported that HBV could actively and promptly (i.e. within minutes/hours after the onset of infection, and in the absence of *de novo* viral synthesis) inhibit host innate responses in order to establish a persistent infection in both HepaRG cells and primary human hepatocytes (study#2 of this thesis manuscript, and (Luangsay et al.)). Interestingly, we showed that an HBV virion-associated factor was responsible for the very early inhibition of dsRNA-mediated IFN response by interfering with TLR3 and RIGI/MDA5 signaling pathways. As HBsAg and HBeAg, the two main bloodstream-secreted viral antigens present in our HBV inoculum, were ruled out as potential early negative regulator of IFN response (study#2 of this thesis manuscript, and (Luangsay et al.)), we hypothesized that HBc, the major protein composing viral nucleocapsid (240 units/capsid) within infectious particles, could be responsible for this inhibition.

To validate this hypothesis, we exposed proliferative HepaRG (pHepaRG) cells for 4 hours to either a complete HBV inoculum (prepared from HepG2.2.15 cells and containing HBV virions, subviral particles (SVPs; HBsAg), and HBeAg), gradient-purified non-enveloped nucleocapsids (NCs), or recombinant HBc (rechHBc; i.e. produced in *Pichia Pastoris*). To allow their cell penetration, NCs and recombinant HBc, were delivered by lipo-transfection as previously reported (Rabe et al., 2006); it is worth noting that lipo-transfection of NCs into hepatoma cells leads to a productive HBV replication cycle, thus validating this experimental delivery approach. For coherence, the whole HBV inoculum was also lipo-transfected. To standardize the various inocula, the same quantity of HBc was used, and a dose of 100 vge/cell for a full HBV inoculum corresponded to 50 pg of HBc/cell. Two doses of each inoculum were used: 100 vge/cell (i.e. 50 pg HBc/cell) or 1000 vge/cell (i.e. 500 pg HBc/cell) corresponding respectively to “low” (**Fig. 1A**) and “high” (**Fig. 1B**) doses of HBV components. Cells were then stimulated by poly(I:C) for an additional 4 hours after removal of the excess viral inoculum, nucleocapsids or core proteins, in order to determine by RT-qPCR the efficacy of the induction of the expression of 4 prototypic innate genes (one type-I IFN, one type-III IFN, one prototypic ISG, one prototypic pro-inflammatory gene) after the engagement of dsRNA sensors. As previously observed with differentiated HepaRG (dHepaRG) cells naturally infected with HBV (study#2 of this thesis manuscript, and (Luangsay et al.)), the transfection

of a complete HBV inoculum into pHepaRG cells could also lead to a significant, dose dependent, inhibition of poly(I:C)-mediated induction of the expression of type-I (IFN- $\beta$ ), type-III (IL-29) IFNs and ISGs (OAS1) genes (**Fig. 1A, 1B**). Importantly, similar results were obtained with both transfected NCs and recHBc, thus suggesting that HBc *per se* could be responsible for this inhibition. Interestingly, neither NCs nor recHBc could inhibit poly(I:C)-mediated induction of IL-6 gene expression, in contrast to that observed with complete HBV inoculum, hence pointing out toward a different type of inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated pro-inflammatory response as previously suggested (study#2 of this thesis manuscript, and (Luangsay et al.)).

To further demonstrate the preeminent role of HBc in the early inhibition of hepatocyte IFN response, we generated a TET-on inducible HepaRG cell line, i.e. HepaRG-TR-HBc, that express HBc under the control of tetracycline. Similar cell lines were also generated for HBs, HBe, HBx, as well as a control protein (e.g. T7 polymerase), and their respective expression checked (**data not shown**). The induction of core protein expression in both pHepaRG and dHepaRG cells was measured in a time- and dose-dependent manner following tetracycline addition (**data not shown, and Supplementary Fig. 1A**). HBc was detected as early as 4 hours post induction, was not secreted, reached a plateau of expression by 48h post induction, and was mainly localized within the nucleus of cells (**Supplementary Fig. 1B-E**). Following HBc induction, cells were stimulated for 4h with poly(I:C) to engage dsRNA sensors (TLR3-RIGI/MDA5), and prototypic innate gene expression was monitored by RT-qPCR in the HepaRG-TR-HBc cells or a negative control cell line (i.e. expressing T7 polymerase; HepaRG-TR-T7). Cells expressing HBc, displayed a sharp decrease of IFN- $\beta$ , IL-29, and OAS1 expression following poly(I:C) stimulation (**Fig 1C**). Confirming results obtained by exposure to NCs or recHBc (**Fig. 1 A and B**), IL-6 expression was not modulated in HBc-expressing cells (**Fig. 1C**). The fact that HBc did not seem to regulate HBV-mediated NF- $\kappa$ B-dependent pro-inflammatory pathways was further demonstrated by the lack of modulation of IL-6 induction (RNA and protein levels) by other TLR agonists (TLR1/2 to TLR9 agonists) (**Fig 1D and E**). It also important to note that the inhibition of the poly(I:C)-mediated induction of IFN and ISGs genes observed in HBc expressing cells, was not observed in cell lines conditionally expressing either HBs, HBe or HBx (**data not shown**). Altogether, these results suggest that HBV may use different strategies to inhibit either IFN or NF- $\kappa$ B-dependent pro-inflammatory response, involving different viral factors. In this respect HBc may be a key

factor for the early inhibition of hepatocyte innate antiviral IFN response and the establishment of viral persistence. Next we aimed at analyzing the molecular details of this inhibition.

### ***The nuclear localization of HBc is required to efficiently suppress dsRNA-mediated IFN response***

It has been proposed, although not definitely and convincingly demonstrated, that HBc could have a nuclear localization in chronic patients within the immune-tolerance phase, in which the virus replicates at high level without apparent opposition of the immune system, whereas HBc would be cytosolic (or have a mixed phenotype of subcellular localization) in the case of patient within the chronic active hepatitis (CAH) phase. Then a nuclear HBc would be associated to high viremia and absence of immune responses. (Akiba et al., 1987; Chevallier-Queyron and Chemin, 2011; Chu and Liaw, 1987)

To investigate whether the nuclear localization of HBc could significantly modulate hepatocyte innate immune responses, dHepaRG-TR-HBc cells were treated, prior to tetracycline induction, with two different anti-capsid molecules, a heteroaryldihydropyrimidine (i.e. BAY41) or a phenylpropenamide derivative (i.e. AT-130) (Brezillon et al., 2011; Feld et al., 2007; Weber et al., 2002). These treatments prevented HBc translocation into the nucleus as shown in **Figure 2A and B**, and reverted the phenotype of HBc-mediated inhibition of the expression of IFN- $\beta$ , IL-29, OAS-1 genes (**Fig. 2C**). Collectively, these results show there is a correlation between HBc nuclear localization and the inhibition of IFN and ISGs gene expression upon engagement of TLR3 or RIGI/MDA5.

### ***Upon HBV infection, HBc can rapidly interact with hepatocyte innate gene promoters to control IFN response***

In non-physiologic conditions (i.e. overexpression of HBc in hepatoma cells), it has been suggested that HBc could interact with host promoters to regulate gene expression. For instance, IFN- $\beta$  and MXa promoters were shown to be repressed by HBc (Rosmorduc et al., 1999; Whitten et al., 1991), whereas HBc was shown to directly bind to ISRE-containing DNA in EMSA experiments (Fernandez et al., 2003). More recently, using more relevant samples (i.e. liver biopsies from HBV infected patients) and chromatin immunoprecipitation (ChIP) microarrays, it was also shown that HBc could bind *in vivo* to a broad spectrum of CpG rich human gene promoters and potentially modulate their expression; functional analyses to validate the results were performed *in vitro* with few genes (Guo et al., 2012).

To determine whether HBc could interact with the promoters of genes shown to be repressed by HBc (**Fig. 1 and 2**), we performed ChIP-qPCR experiments on TET-induced HepaRG-TR-HBc cells using an anti-HBc Ab (and control Ab) and primers specific for IFN- $\beta$ , IL-29, OAS1 and IL-6 promoters, as well as primers specific to control promoters. HBc was found to interact with IFN- $\beta$ , IL-29 and OAS-1 promoters, but not with IL-6 promoter, as early as 4 hours post induction, with a maximal binding occurring at 24 h post induction (**Fig. 3A**), which correlated with the maximal expression of the protein (**Supplementary Fig.1C**). Interestingly, the inhibition of the nuclear localization of HBc by anti-capsid treatments resulted in a marked decrease of the interaction between HBc and gene promoters in HBc-expressing cells (**Fig. 3B**).

To further demonstrate, in a more relevant setting, that HBc inhibit IFN and ISGs gene expression by directly interfering with innate gene transcription, we infected PHHs with HBV and monitored in a tight kinetical manner the inhibition of poly(I:C)-mediated induction of prototypic innate gene expression, as well as the binding of HBc to the promoters of these genes. As previously observed in HepaRG cells (study#2 of this thesis manuscript, and (Luangsay et al.)), a strong and early inhibition of IFN response in HBV-infected PHH stimulated with poly(I:C) was observed as early as 2h post HBV exposure, and thereafter, for IFN- $\beta$ , IL-29 and OAS-1 genes, whereas a delayed inhibition was observed for IL-6 (**Fig. 3C**). The early inhibition of IFN- $\beta$ , IL-29 and OAS-1 gene expression correlated with the early binding of HBc on the promoters of these genes (**Fig. 3D**). Interestingly, the delayed inhibition of IL-6 expression during HBV infection of PHH was not associated with the binding of HBc on IL-6 promoter (**Fig. 3D**), thus confirming that HBc does not regulate IL-6 transcription. The trafficking of NCs and translocation of HBc to the nucleus are obviously important to enable binding of HBc to promoters. Short term and non-cytotoxic treatment with nocodazole was shown to prevent such a trafficking and translocation of HBc to nucleus (Rabe et al., 2006). In our case, treatment with nocodazole during HBV infection prevented the binding of HBc to target promoters as evidence by a ChIP-qPCR experiment (**data not shown**). Altogether, these results suggest that in the very early phase of infection, HBc from “incoming” virions could, after trafficking through the cytosol and translocation into the nucleus, actively inhibit IFN response by interfering with gene expression via binding to their promoters.

***HBc recruits on target genes histone methyltransferases that are involved in the establishment of repressive epigenetic marks***

We postulated that HBc-mediated repression of innate genes could be either due to competitive binding to site otherwise bound by transcription factors, such as IRF3/7, or to the recruitment of enzyme involved in chromatin remodeling. Several virus were shown to manipulate the epigenetic state of the host genome notably by modifying the histone methylation status (Berger, 2007; Ferrari et al., 2012; Fonseca et al., 2012; Niller et al., 2009).

We performed ChIP studies on HBc-expressing cells using antibodies directed either against hypermethylated histones or two histone methyltransferases, which are involved in histone methylation at position K27 and K9, namely Ezh2 and G9a (Czermin et al., 2002; Wu et al., 2011). The samples were then analyzed by qPCR with primers specific for IFN- $\beta$ , IL-29, OAS1 or control promoters. Results showed significant enrichments of repressive histone marks (H3K9me3 and H3K27me3) on IFN- $\beta$ , IL-29 and OAS1 promoters, as early as 4h post HBc expression by TET induction. The enrichments of these repressive marks further increased at 24 h post induction, thus mirroring the pattern of HBc expression after TET treatment and defining a dose response (**Fig.4A**). While repressive marks increased significantly as HBc accumulated in cells, active histone marks, measured by ChIP with anti-H3K4me3 antibodies, remained low throughout the kinetic of expression of HBc (**Fig.4A**). Confirming these results, we also found that Ezh2 and G9a, which are involved in the establishment of repressive H3K27me3 and H3K9me3 modifications, on HBc-regulated promoters (**Fig.4B**).

Our data suggest that HBc recruit to promoters it binds to histone methyltransferases Ezh2 and G9a, which are responsible for the establishment of epigenetic repressive marks by tri-methylation of histone-3 at position K9 and K27. Therefore the inhibition of IFN response can be due to very early epigenetic reprogramming of innate genes after the binding of “incoming HBc” into cells upon HBV entry.

***Long-term maintenance of the HBc-mediated inhibition of IFN response***

To investigate whether the observed IFN response inhibition could be a long lasting mechanism mediated by HBc in chronically HBV-infected hepatocytes, we next infected PHH with HBV and stimulated these cells with poly(I:C) after 12 days of infection, when HBV

infection was considered as established and persistent in this *in vitro* model. As previously observed in poly(IC)-stimulated pHepaRG cells infected for 12 days (study#2 of this thesis manuscript, and (Luangsay et al.)), a strong inhibition of the dsRNA-mediated innate immunity gene expression was observed (**Fig. 5A**), thus confirming that the inhibitory mechanism set early was yet operating in the persistent phase.

To complement this *in vitro* analysis, we also investigated the sub-cellular localization of HBc proteins in the hepatocytes of liver-humanized FRG mice (Bissig et al., 2010), which were chronically infected with HBV. Mice persistently infected and showing high levels of HBV DNA and viral proteins in the serum and liver (**Supplementary Fig. 2**), were assessed for the cellular distribution of HBc by immunohistostaining (IHS) in the humanized mouse liver (**Fig.5B**). Widespread clusters of human hepatocyte repopulation (FAH staining) were observed throughout the liver section (**Fig.5B upper panels**) and were found similar between control and HBV-infected mice. IHS of HBcAg also showed a preferential localization of HBc within cell nucleus (**Fig.5B lower panels**) as previously seen in HBc-expressing HepaRG cells (**Supplementary Fig.1**) and in liver biopsies of chronically HBV infected patients during the immune-tolerance phase (Akiba et al., 1987; Chevallier-Queyron and Chemin, 2011; Chu and Liaw, 1987). Eventually, ChIP experiments were also performed to measure HBc binding to innate gene promoters in the liver of these chronically HBV-infected mice (**Fig.5C**). Results showed a strong interaction of HBc with IFN- $\beta$ , IL-29 and OAS1 gene promoters, but not with IL-6 promoter. The latter results demonstrate that HBc can also interact in the chronic setting *in vivo* with innate gene promoters in order to regulate their transcription.

## Discussion

Viruses chronically infecting their host need to deploy various strategies to inhibit host immune responses. In this respect, HBV is a very particular virus amongst viruses, which are capable to progress to chronic infection. HBV is one of the most successful and harmful virus, as it chronically infect around 250 millions people worldwide, who are at risk to develop severe cirrhosis and liver cancer. HBV infection account for 50% of liver cancer worldwide, and liver cancer is ranked at third position in terms of mortality (Arzumanyan et al., 2013; El-Serag, 2012). The transmission of this viral infection and its progression to chronicity is particular in the sense that more than 90% of infected new-borns (or very young infants) progress to chronicity, whereas only less than 10% of infected immune-competent adults do so (McMahon, 2010). This suggests that this virus can be relatively well controlled in immune-competent adults. However, when the virus manage to progress to chronicity in these adults, it does replicate at extremely high levels (up to  $10^{10}$  vge/mL) for years without any immune opposition, suggesting that, in at least some adults, the virus can set up efficient and long lasting evasion strategies. Another particular feature of chronic HBV infections is that they are rather resistant to IFN treatments, thus suggesting a complex interplay between HBV and the IFN response (Christen et al., 2007).

Acute HBV infections are not accompanied by the production of IFN in the bloodstream of patients (Dunn et al., 2009; Stacey et al., 2009) or in the liver of infected chimpanzees (Wieland et al., 2004). Similar observations were made in the context of viral reactivation in human (Tan et al., 2010). As for others viruses (Bowie and Unterholzner, 2008; Heim, 2013; Manel and Littman, 2011; Randall and Goodbourn, 2008), HBV has likely evolved mechanisms to prevent and/or escape IFN response. Our interest was on the inhibition of signaling pathways, which are just downstream of PRRs sensing. Using rather non-physiological cell culture models and levels of expression of protein, several groups have pointed out the role of HBx, HBV polymerase, and HBc has potential regulator of the induction of the expression of type-I IFN (Jiang and Tang, 2010; Wang and Ryu, 2010; Wang et al., 2010; Wei et al., 2010; Whitten et al., 1991; Wu et al., 2007; Yu et al., 2010). In this paper, we demonstrate more convincingly, because in a more physiological setting (i.e. proper infection of PHH or closely related cells), that HBc is indeed a key very early negative regulator of the IFN response. Indeed, we have shown that HBc, which is already contained



within “incoming” HBV virions, can inhibit IFN response after trafficking of nucleocapsids (NCs) through the cytosol and translocation of HBc into the nucleus where it represses IFN response gene expression after binding to target promoters. In a previous study, we showed that this inhibition could be seen as early as 2 hours after the onset of infection (Luangsay et al.), and in this study we show that HBc can be found on the promoter of target genes after only 4h of exposure (**Fig. 3**). Others have found that, after experimental lipo-transfection of NCs to cells, the delivery of HBV genomic DNA into the nucleus takes only few minutes (Rabe et al., 2006), thus confirming that HBc can be rapidly found in the nucleus of neo-infected cells, where it can play its immuno-modulatory role. HBc is capable to bind to dsDNA, likely via the same domain required for RNA binding. Regarding the specificity of binding, if further work is warranted, it is worth noting that all the promoters of targeted genes contained ISRE motifs. EMSA experiment also showed that HBc could bind to ISRE-containing dsDNA (Fernandez et al., 2003). Time course ChIP-seq experiments are ongoing in PHHs infected cells to determine the kinetic of interaction with genes and determine cluster of genes, which are targeted very early, in a delayed manner, or later by HBc. The precocity of the action of HBc explains why the nascent innate response, evidenced previously (study#2 of this thesis (Luangsay et al.)), is blunted and why no IFN is produced upon infection. HBV is indeed a “stealth” virus, not because of absence of detection, but rather because of a very early inhibition of innate immune responses.

In the nucleus of neo-infected cells, HBc can bind to promoters of IFN response genes, and recruit histone methyltransferases Ezh2 and G9a, which are responsible for the establishment of epigenetic repressive marks (H3K9me2/me3 and H3K27me2/me3) (Nakayama et al., 2001; Ng et al., 2009), leading to the impairment of their inducibility upon dsRNA sensors stimulation (**Fig. 4**). The binding of HBc to IFN response gene promoters was also found in liver-humanised HBV-infected FRG mice (**Fig. 5** and (Bissig et al., 2010)), thus suggesting that this early-established mechanism can be persistent. In chronically infected patients HBc was also found in the nucleus of hepatocytes (Akiba et al., 1987; Chevallier-Queyron and Chemin, 2011; Chu and Liaw, 1987; Nakayama et al., 2001; Ng et al., 2009), in particular in patients who are in the immune-tolerance phase. Although we could not get access ourselves to human samples in the immune-tolerance phase to evidence the binding of HBc on IFN response gene promoters, others have shown on biopsies samples that HBc could bind to many CpG rich human promoters, including those of genes involved in the



dsRNA cellular response (Guo et al., 2012). The correlation between the nuclear localization of HBc and the immune-tolerance phase might be explained, at least in part, by the inhibitory mechanism we have described here.

As we have shown that the virus does not need to replicate to deliver HBc to the nucleus of hepatocytes, HBc could be delivered in other cell types to set similar inhibitory effect. Indeed in the immune tolerance phase, a high amount of infectious particles, containing HBc, circulates in the blood of patients (between  $10^7$  and  $10^{10}$  HBV-genome-copies/mL) (Seeger and Mason, 2000), and this concentration may be even higher in the liver microenvironment, thus submerging cells in number. It has been suggested that HBV could penetrate into LSEC (liver sinusoidal endothelial cells) (Breiner et al., 2001), Kupffer cells (Esser et al., 2012), and pDC (Vincent et al., 2011), which are three important cell types to mount an efficient innate response. Our preliminary data suggest that indeed HBc could be delivered to the nucleus of LSEC and KC, and lead to impairment of IFN gene expression **(data not shown)**. Therefore, it may be that the new concept of IFN response inhibition we described for hepatocytes may also be valid for many other non-parenchymal and/or liver resident immune cells.

We have shown, in our model of HBc-expressing cells, that if we can prevent the migration of HBc to the nucleus we can restore the inducibility of IFN response genes by dsRNA sensors ligands. Does this mean that anti-capsids could be used *in vivo* to restore immune function in infected hepatocytes and, in the end, help breaking immune tolerance? To substantiate this hypothesis, we would need to demonstrate first that anti-capsids are capable to purge HBc from already infected cells. As HBc possesses both nuclear localization (NLS) and export (NES) sequences, as it has been proposed that the pool of nuclear cccDNA could be constantly replenished by NCs recycling (Seeger and Mason, 2000), and despite its long-half life in the nucleus **(data not shown)**, it is tempting to speculate that a long-term treatment with anti-capsid drugs could lead to such a purge. Then it could be also shown that combination therapy with anti-capsid drugs plus TLR agonists (e.g. TLR3 or TLR7) could restore the production of IFN within infected and other cells. Evaluation of TLR7 agonist (e.g. GS-9620) to treat HBV infections is on progress (Lanford et al., 2011). Years ago, anti-capsid molecules have been tentatively developed to complement the anti-HBV arsenal (Zlotnick and Mukhopadhyay, 2011). These molecules did not make it to the clinic because of lack of efficacy and toxicity. But the development of such molecules should be now reconsidered as

403 these molecules, beside acting on the encapsidation of viral pgRNA and prevent release of  
404 infectious infectious particles, may also restore immune functions within infected cells and  
405 in the liver microenvironment. Their combination with currently used nucleos(t)ide  
406 analogues, which was recently shown to be efficient *in vitro* (Billioud et al., 2011), could be  
407 also envisaged.

408

## Material and Methods

### *HepaRG cells and primary human hepatocyte culture*

The human liver progenitor HepaRG cells (Gripon et al., 2002) were cultured for 2 weeks in complete William's medium (Gibco) supplemented with 10% FCS Fetal Clone II serum (Thermo scientific), 50 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco), 2 mM glutaMax (Gibco), 5 µg/mL human insulin (Sigma), and  $5 \times 10^{-5}$  M hydrocortisone hemisuccinate (UpJohn, SERB) at 37°C in humidified CO<sub>2</sub> (5%) incubators and differentiated into hepatocyte-like cells by a treatment with 1.8% DMSO (Hybrid-max, Sigma) for two weeks as previously described (Hantz et al., 2009) . Primary human hepatocytes (PHHs) were prepared from surgical liver resections after informed consent of patients (kindly provided by Pr. Rivoire (CLB, Lyon)) as previously described (Lecluyse and Alexandre, 2010) and cultured in complete William's medium supplemented with 1.8 % of DMSO.

### *Antibodies and others reagents*

All chemicals were purchased from Sigma Aldrich unless otherwise specified. Antibodies for ChIP experiments were purchased from Diagenode (anti-H3K9me3 pAb-013-050, anti-H3K27me3 pAb-069-050, anti-H3K4me3 pAb-003-050, anti-Ezh2 pAb-039-050), Sigma (anti-G9a G6919) or homemade (polyclonal against HBc; (Petit and Pillot, 1985). A polyclonal rabbit anti-HBc from Dako was used for immunohistostainings.

### *Generation of HBV core protein- expressing HepaRG cells*

To generate recombinant cell line we used lentiviral vectors and procedures from Invitrogen (ViraPower™ T-REx™ Lentiviral Expression System). Stable sur-expression of the tetracycline repressor (TR) in HepaRG cells was obtained after transduction with a lentivirus (multiplicity of infection of 5) produced upon cotransfection of HEK-293 cells with pLenti6-TR plasmid and packaging vectors according to manufacturer's instructions. Blasticidin-resistant HepaRG-TR cells were then transduced with a second lentivirus conferring zeocin resistance and containing an HBc (genotype D, serotype ayw, Galibert's strain) or a T7 phage polymerase transgene, and produced upon cotranfection of HEK-293 cells with packaging vetors and with corresponding pLenti4/TO plasmids, in which transgene are under the control of a tetracycline-regulated promoter. HepaRG-TR-HBc and HepaRG-TR-T7pol were derived by coselection with blasticidin and zeocin.

#### **Humanized FRG mouse model and HBV infection**

All animal studies were reviewed and approved by a local ethical comity. The highly immunosuppressed FRG mice (Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup>), deficient for T-, B- and NK-cells were used (Azuma et al., 2007) and maintained in a specific pathogen-free facility. High quality, cryopreserved human hepatocytes were purchased (BD, Biosciences) and injected via an *intra-splenic* route into 2 to 3 month old mice as described previously. Liver humanized Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup> mice featuring a seric production of human albumin of at least 5mg/mL were infected with 200 µl of HBV inoculums (1.10<sup>8</sup> veg to 1.10<sup>9</sup> veg in PBS) via *intra-peritoneal* route (Bissig et al., 2010).

Serum was harvested every week by retro-orbital bleeding and stored at -80°C in aliquots for further antigenemia and viremia analysis. Mice were sacrificed 9 weeks post-infection and hepatic tissues were processed for RT-qPCR and ChIP analysis or fixed in formalin and embedded in paraffin for immunostaining.

#### **Production of HBV inoculums, Dane particles and non-enveloped HBV nucleocapsids**

The HBV inoculum was obtained from HBV stably transfected HepG2 cell line, clone 2.2.15 (HepG2.2.15) cultivated in DMEM medium (Gibco) supplemented with 2% FBS fetal bovine serum (Thermo scientific), 50 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco), 2mM glutaMax (Gibco), 2% DMSO (Hybrid-max, Sigma), 110 µg/ml sodium pyruvate (Gibco) and non-essential amino acids (Gibco). HepG2.2.15 supernatant was clarified at low speed, filtered (cut-off of 0.45µm), precipitated overnight at 4°C with 8% PEG-8000, and centrifuged at 5000g for 1h to pellet HBV virions as previously described (Luangsay et al.). A control “HBV-negative” inoculum (control mock) was concentrated from HepG2.2.15 cells cultured under the same condition, but with addition of Lamivudine (100µM) in order to block the production of infectious particles. After PEG precipitation, the inoculum was filtered on centrifugal filter device (Amicon Ultracel 10K, Millipore) to further remove residual subviral particles and secreted HBeAg to obtain the mock control. The mock supernatant was then analyzed by ELISA to evidence the absence of HBsAg and HBeAg. After DNA extraction (QIAmp Ultrasens Virus kit, Qiagen), HBV inoculum was tittered by qPCR with forward 5'-GCTGACGCAACCCCACT-3' and reverse 5'-AGGAGTTCCGCAGTATGG-3' probes using a standard curve from a quantified HBV encoded plasmid. All preparations were tested for the absence of endotoxin (Lonza Verviers, Belgium).

To obtain purified infectious particles (Dane particles; density of 1.18-1.21 g/mL), the HBV inoculum obtained after PEG precipitation was purified by ultracentrifugation on a sucrose density gradient. Briefly, 2ml aliquots of 20,30,40,50% (w/w) sucrose in a solution containing 10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 1mM EDTA were carefully layered in a ultracentrifuge tube. The HBV inoculum was layered on this sucrose gradient, and ultracentrifugation was performed at 35000 rpm for 16h at 4°C in a Beckman SW41Ti rotor. Fractions were collected from top to bottom and each fraction was tested for sucrose density, HBV DNA, HBeAg and HBsAg. The amount of HBsAg and HBeAg were measured by commercial immunoassay kits according to the manufacturer's protocols (Autobio Diagnostics Co., China) and HBV DNA was quantified by qPCR. To eliminate sucrose contamination, each fraction was diluted in William's medium (<1% sucrose) and precipitated using 8% PEG-8000. Further analysis confirmed by transmission electron microscopy 1200EX (JEOL) the intact shape of the Dane particles and HBV replication in the Dane inoculated HepaRG cells was performed to confirm their infectivity (data not shown). Non-enveloped nucleocapsids (density of 1.25 g/mL) were purified, as previously described (Rabe et al., 2006), from NP40-treated HepG2.2.15. supernatant similarly to that described above for Dane particles. All preparations were tested for the absence of endotoxin (Lonza Verviers, Belgium).

#### ***HBV infection and lipo-transfection of recombinant HBcAg and non enveloped nucleocapsids***

Differentiated HepaRG cells and PHH were infected with HBV or its control mock (depleted from HBsAg, HBeAg and infectious Dane particles) in complete William's medium supplemented with 4% PEG-8000 at 37°C as previously described (Hantz et al., 2009). Recombinant particular HBcAg (Meridian, life science, Inc.) and non-enveloped nucleocapsids were lipo-transfected into proliferative HepaRG cells using Pro-Ject Protein Transfection Reagent kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific).

#### ***PRRs stimulation***

Cells were stimulated with TLR or RLR agonists (Invivogen) and harvested for the analysis of the innate gene expression (after 4h) and cytokines production (after 6h). TRL and RLR agonist were: TLR1/2 (Pam3CSK4, 0.8 µg/ml), TLR3 (Poly(I:C), 10 µg/ml), TLR4 (LPS, 0.4µg/ml), TLR5 (Flagellin, 0.1 µg/ml), TLR6 (FSL-1, 0.1 µg/ml), TLR7/8 (ssRNA40, 10 µg/ml), RIGI/MDA5 (Poly(I:C) Lyovec 0.2 µg/ml).

### **RNA extraction and qRT-PCR**

Total RNA were purified with the Nucleospin RNA II kit according to the manufacturer's protocol (Macherey Nagel). cDNA was obtained after reverse transcription using the SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life technologies) and qPCR was performed using the Express SYBR GreenER qPCR Supermix Universal according to the manufacturer's instructions (Life technologies) and run on the MyiQ Biorad machine. The relative mRNA expression was analyzed with q-base software (Biogazelle, Belgium) using the comparative cycle threshold ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method with 2 housekeeping genes (RPLP0 and  $\beta$ -Actin). The relative HBV mRNA level was quantified using the same primer pairs used for the HBV PCR quantification. The sequences of primer pairs were listed on **Table 1**.

### **Western Blotting**

Cells were lysed in TTB buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 7.5) for total proteins extraction or in NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific) for nuclear and cytosolic proteins separation. All lysis buffers were complemented with inhibitor cocktail of proteases (Complete EDTA-free tablets, Roche). Extracted proteins were separated electrophoretically on a 10% SDS-PAGE gel and "semi-dry" transferred onto hybond-ECL membranes (Amersham, biosciences). Membranes were blocked with 5% non-fat milk in PBS 0,1% Tween for 1 hr at RT. Polyclonal rabbit anti-HBc (Petit and Pillot, 1985), anti-actin (13E5, Cell Signaling), anti-tubulin (MAB3408, Millipore) and anti-PARP (Zymed, invitrogen) antibodies were applied overnight at 4°C under gentle agitation. After washing, HRP conjugated secondary antibodies from Sigma Blots were applied. After extensive washing, blots were revealed using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific).

### **ELISA**

Commercial immunoassay kits for HBs antigen (Autobio Diagnostics Co., China), HBe/HBc antigens (Autobio Diagnostics Co., China) and IL-6 cytokine (R&D system) detections were used following manufacturer's instructions.

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays**

Cells were fixed with formaldehyde 1% at room temperature with rocking to capture the DNA-protein interaction and cross-linking was stopped with Glycine 0.125M (Euromedex). Cells were washed 3 times with ice-cold PBS 1X then scrapped and lysed in 500µl of lysis buffer per  $10^7$  cells (50 mM Tris HCl pH8, 10 mM EDTA, 1% SDS and protease inhibitor

cocktail (Complete EDTA-free tablets, Roche)) for 5 min in ice. Cell lysates were sonicated to reduce DNA length to 200 bp using a Bioruptor system (Diagenode). The sheared chromatin extract was then frozen in aliquots at -80°C until use. Sheared chromatin (100 µl) was diluted 10-fold in RIPA buffer (10 mM Tris HCl pH5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate, protease inhibitor cocktail) and then pre-blocked with protein A sepharose 4B (Sigma) for 2 hours at 4°C under gentle agitation. Pre-blocked chromatin was incubated overnight with rotation at 4°C with 10µg of specific antibodies. An additional sample of lysate containing no antibody was also incubated overnight at 4°C (no antibody control). Chromatin was then immunoprecipitated with magnetic beads (Dynabeads Protein G, Novex) for 2 h at 4°C with rotation. After several washes with RIPA buffer, cross-linking was reversed at 68°C for 2h under shaking in elution buffer (20 mM Tris HCl pH7.5, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% SDS, 50 µg/ml proteinase K (Eurobio) and inhibitor cocktail proteases). DNA from elution buffer was extracted with Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alcohol and precipitated with ethanol supplemented with NaAc 3M and Glycogen 20mg/ml (Sigma) overnight at -20°C. Extracted DNA from non-immunoprecipitated fraction of no antibody control was used as internal control (total input). Extracted DNA was used as template for qPCR specific on IFN-βp, IL-29p, IL-6p, OAS-1p and GAPDHp. The percentage of input enrichment ( $2^{\Delta\Delta Ct}$  (total input – antibody input)) was normalized on the Mock condition depending of the experiments (no tetracycline stimulation or no HBV infection) and also on GAPDH housekeeping gene promoter. Results are representative of 3 independents experiments. The list of primer pairs is given on **Table2**.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using the Dixon and the nonparametric Mann-Whitney tests using the GraphPad Prism software. For all tests, a p-value  $\leq 0.05$  (\*) was considered as significant.



## Acknowledgments

The authors would like to thank Lydie Lefrançois and Judith Fresquet for the isolation of primary human hepatocytes, as well as the staff from Pr Michel Rivoire's surgery room for providing us with liver resection. This work was supported by grants from ANRS (French national agency for research on AIDS and viral hepatitis; several grants from CSS4), FINOVI (Foundation for innovation in infectiology; project call n°4), FRM (Foundation for medical research; DEQ20110421327), Hoffmann-La-Roche (U.S.A. division) and by INSERM core grants. This work was also supported by the DEVweCAN LABEX (ANR-10-LABX-0061) of the "Université de Lyon", within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR).

## References

- Ait-Goughoulte, M., Lucifora, J., Zoulim, F., and Durantel, D. (2010). Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. *Viruses* 2, 1394-1410.
- Akiba, T., Nakayama, H., Miyazaki, Y., Kanno, A., Ishii, M., and Ohori, H. (1987). Relationship between the replication of hepatitis B virus and the localization of virus nucleocapsid antigen (HBcAg) in hepatocytes. *J Gen Virol* 68 ( Pt 3), 871-877.
- Arzumanyan, A., Reis, H.M., and Feitelson, M.A. (2013). Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer* 13, 123-135.
- Azuma, H., Paulk, N., Ranade, A., Dorrell, C., Al-Dhalimy, M., Ellis, E., Strom, S., Kay, M.A., Finegold, M., and Grompe, M. (2007). Robust expansion of human hepatocytes in Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup> mice. *Nat Biotechnol* 25, 903-910.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.
- Bertoletti, A., and Ferrari, C. (2012). Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut* 61, 1754-1764.
- Billioud, G.t., Pichoud, C., Puerstinger, G., Neyts, J., and Zoulim, F. (2011). The main Hepatitis B virus (HBV) mutants resistant to nucleoside analogs are susceptible in vitro to non-nucleoside inhibitors of HBV replication. *Antiviral Research* 92, 271-276.
- Bissig, K.D., Wieland, S.F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T.T., Chisari, F.V., and Verma, I.M. (2010). Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* 120, 924-930.
- Bowie, A.G., and Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8, 911-922.
- Breiner, K.M., Schaller, H., and Knolle, P.A. (2001). Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepatology* 34, 803-808.
- Brezillon, N., Brunelle, M.N., Massinet, H., Giang, E., Lamant, C., DaSilva, L., Berissi, S., Belghiti, J., Hannoun, L., Puerstinger, G., et al. (2011). Antiviral activity of Bay 41-4109 on hepatitis B virus in humanized Alb-uPA/SCID mice. *PLoS One* 6, e25096.
- Chevallier-Queyron, P., and Chemin, I. (2011). Immunohistochemistry as a tool for chronic hepatitis diagnosis. In *Liver biopsy*, H. Takahashi, ed. (Janeza Trdine, InTech), pp. 49-62.



603 Christen, V., Duong, F., Bernsmeier, C., Sun, D., Nassal, M., and Heim, M.H. (2007). Inhibition of alpha  
604 interferon signaling by hepatitis B virus. *J Virol* 81, 159-165.

605 Chu, C.M., and Liaw, Y.F. (1987). Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in  
606 chronic hepatitis B virus infection. Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core  
607 antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology* 92, 220-225.

608 Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrotta, V. (2002). Drosophila enhancer of  
609 Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal  
610 Polycomb sites. *Cell* 111, 185-196.

611 Dandri, M., and Locarnini, S. (2012). New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection.  
612 *Gut* 61 Suppl 1, i6-17.

613 de Weerd, N.A., and Nguyen, T. (2012). The interferons and their receptors--distribution and  
614 regulation. *Immunol Cell Biol* 90, 483-491.

615 Dunn, C., Peppas, D., Khanna, P., Nebbia, G., Jones, M., Brendish, N., Lascar, R.M., Brown, D., Gilson,  
616 R.J., Tedder, R.J., *et al.* (2009). Temporal analysis of early immune responses in patients with acute  
617 hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 137, 1289-1300.

618 El-Serag, H.B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*  
619 142, 1264-1273 e1261.

620 Esser, K., Chen, X.M., Broxtermann, M., Gasteiger, G., Wohlleber, D., Lucifora, J., Hartmann, D.,  
621 Hueser, N., Nussler, A., Heikenwalder, M., *et al.* (2012). Hepatitis B virus hijacks neutral lipid  
622 transport to target the liver and infect hepatocytes. *Hepatology* 56, 212A-212A.

623 Fattovich, G., Bortolotti, F., and Donato, F. (2008). Natural history of chronic hepatitis B: special  
624 emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol* 48, 335-352.

625 Feld, J.J., Colledge, D., Sozzi, V., Edwards, R., Littlejohn, M., and Locarnini, S.A. (2007). The  
626 phenylpropenamide derivative AT-130 blocks HBV replication at the level of viral RNA packaging.  
627 *Antiviral Res* 76, 168-177.

628 Fernandez, M., Quiroga, J.A., and Carreno, V. (2003). Hepatitis B virus downregulates the human  
629 interferon-inducible MxA promoter through direct interaction of precore/core proteins. *J Gen Virol*  
630 84, 2073-2082.

631 Ferrari, R., Su, T., Li, B., Bonora, G., Oberai, A., Chan, Y., Sasidharan, R., Berk, A.J., Pellegrini, M., and  
632 Kurdistani, S.K. (2012). Reorganization of the host epigenome by a viral oncogene. *Genome Res* 22,  
633 1212-1221.

634 Fonseca, G.J., Thillainadesan, G., Yousef, A.F., Ablack, J.N., Mossman, K.L., Torchia, J., and Mymryk,  
635 J.S. (2012). Adenovirus evasion of interferon-mediated innate immunity by direct antagonism of a  
636 cellular histone posttranslational modification. *Cell Host Microbe* 11, 597-606.

637 Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaize, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C.,  
638 and Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc*  
639 *Natl Acad Sci U S A* 99, 15655-15660.

640 Guo, Y., Kang, W., Lei, X., Li, Y., Xiang, A., Liu, Y., Zhao, J., Zhang, J., and Yan, Z. (2012). Hepatitis B viral  
641 core protein disrupts human host gene expression by binding to promoter regions. *BMC Genomics*  
642 13, 563.

643 Hantz, O., Parent, R., Durantel, D., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., and Zoulim, F. (2009).  
644 Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like  
645 cells. *J Gen Virol* 90, 127-135.

646 Heim, M.H. (2013). Innate immunity and HCV. *J Hepatol* 58, 564-574.

647 Jiang, J., and Tang, H. (2010). Mechanism of inhibiting type I interferon induction by hepatitis B virus  
648 X protein. *Protein Cell* 1, 1106-1117.

649 Lanford, R.E., Guerra, B., Chavez, D.C., Hodara, V.L., Zheng, X., Wolfgang, G., and Tumas, D. (2011).  
650 THERAPEUTIC EFFICACY OF THE TLR7 AGONIST GS-9620 FOR HBV CHRONIC INFECTION IN  
651 CHIMPANZEES. *J Hepatol* 54, S45-S45.

652 Lecluyse, E.L., and Alexandre, E. (2010). Isolation and culture of primary hepatocytes from resected  
653 human liver tissue. *Methods Mol Biol* 640, 57-82.

654 Luangsay, S., Gruffaz, M., Ait-Goughoulte, M., Isorce, N., Testoni, B., Michelet, M., Rivoire, M.,  
655 Fletcher, S., Javanbakht, H., Durantel, D., *et al.* Early inhibition of hepatocyte innate responses by  
656 HBV facilitates establishment of a persistent infection. *Cell Host & Microbe*, *Submitted*.

657 Manel, N., and Littman, D.R. (2011). Hiding in plain sight: how HIV evades innate immune responses.  
658 *Cell* 147, 271-274.

659 McMahon, B.J. (2010). Natural history of chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis* 14, 381-396.

660 Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9  
661 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110-113.

662 Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., and Klose, R.J. (2009). Dynamic protein methylation in  
663 chromatin biology. *Cell Mol Life Sci* 66, 407-422.

664 Niller, H.H., Wolf, H., and Minarovits, J. (2009). Epigenetic dysregulation of the host cell genome in  
665 Epstein-Barr virus-associated neoplasia. *Semin Cancer Biol* 19, 158-164.

666 Petit, M.A., and Pillot, J. (1985). HBc and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core  
667 protein P22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. *J Virol*  
668 53, 543-551.

669 Rabe, B., Glebe, D., and Kann, M. (2006). Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into  
670 nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection  
671 events. *J Virol* 80, 5465-5473.

672 Randall, R.E., and Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction,  
673 signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89, 1-47.

674 Rosmorduc, O., Sirma, H., Soussan, P., Gordien, E., Lebon, P., Horisberger, M., Brechot, C., and  
675 Kremsdorf, D. (1999). Inhibition of interferon-inducible MxA protein expression by hepatitis B virus  
676 capsid protein. *J Gen Virol* 80 ( Pt 5), 1253-1262.

677 Seeger, C., and Mason, W.S. (2000). Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 51-68.

678 Seeger, C., Zoulim, F., and Mason, W.S. (2007). Hepadnaviruses. In *Fields Virology*, L.W.a. Wilkins, ed.  
679 (Philadelphia, Knipe, D.M.  
680 Howley, P.M.), pp. 2977-3030.

681 Stacey, A.R., Norris, P.J., Qin, L., Haygreen, E.A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li,  
682 D., Grove, D., *et al.* (2009). Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in  
683 acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed  
684 responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol* 83, 3719-3733.

685 Tan, A.T., Koh, S., Goh, W., Zhe, H.Y., Gehring, A.J., Lim, S.G., and Bertoletti, A. (2010). A longitudinal  
686 analysis of innate and adaptive immune profile during hepatic flares in chronic hepatitis B. *J Hepatol*  
687 52, 330-339.

688 Vincent, I.E., Zannetti, C., Lucifora, J., Norder, H., Protzer, U., Hainaut, P., Zoulim, F., Tommasino, M.,  
689 Trepo, C., Hasan, U., *et al.* (2011). Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in  
690 plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 6, e26315.

691 Wang, B.X., and Fish, E.N. (2012). The yin and yang of viruses and interferons. *Trends Immunol* 33,  
692 190-197.

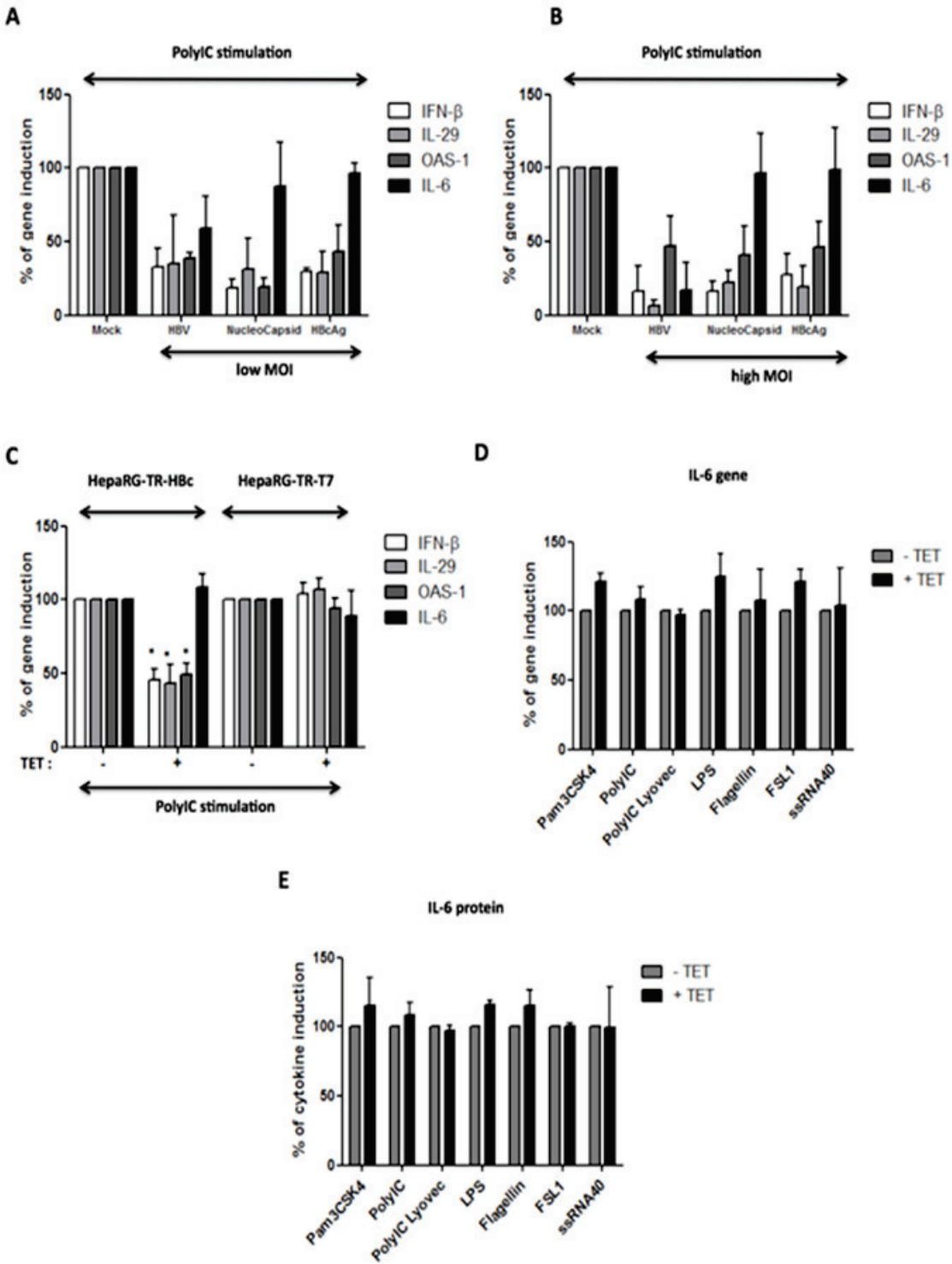
693 Wang, H., and Ryu, W.S. (2010). Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor  
694 signaling via interaction with DDX3: implications for immune evasion. *PLoS Pathog* 6, e1000986.

695 Wang, X., Li, Y., Mao, A., Li, C., and Tien, P. (2010  
696 ). Hepatitis B virus X protein suppresses virus-triggered IRF3 activation and IFN-beta induction by  
697 disrupting the VISA-associated complex. *Cell Mol Immunol* 7, 341-348.

698 Weber, O., Schlemmer, K.H., Hartmann, E., Hagelschuer, I., Paessens, A., Graef, E., Deres, K.,  
 699 Goldmann, S., Niewoehner, U., Stoltefuss, J., *et al.* (2002). Inhibition of human hepatitis B virus (HBV)  
 700 by a novel non-nucleosidic compound in a transgenic mouse model. *Antiviral Res* 54, 69-78.  
 701 Wei, C., Ni, C., Song, T., Liu, Y., Yang, X., Zheng, Z., Jia, Y., Yuan, Y., Guan, K., Xu, Y., *et al.* (2010). The  
 702 hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral  
 703 signaling protein. *J Immunol* 185, 1158-1168.  
 704 Whitten, T.M., Quets, A.T., and Schloemer, R.H. (1991). Identification of the hepatitis B virus factor  
 705 that inhibits expression of the beta interferon gene. *J Virol* 65, 4699-4704.  
 706 Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2004). Genomic analysis of the host response  
 707 to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6669-6674.  
 708 Wieland, S.F., Eustaquio, A., Whitten-Bauer, C., Boyd, B., and Chisari, F.V. (2005). Interferon prevents  
 709 formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids. *Proc Natl Acad*  
 710 *Sci U S A* 102, 9913-9917.  
 711 Wu, H., Chen, X., Xiong, J., Li, Y., Li, H., Ding, X., Liu, S., Chen, S., Gao, S., and Zhu, B. (2011). Histone  
 712 methyltransferase G9a contributes to H3K27 methylation in vivo. *Cell Res* 21, 365-367.  
 713 Wu, M., Xu, Y., Lin, S., Zhang, X., Xiang, L., and Yuan, Z. (2007). Hepatitis B virus polymerase inhibits  
 714 the interferon-inducible MyD88 promoter by blocking nuclear translocation of Stat1. *J Gen Virol* 88,  
 715 3260-3269.  
 716 Yu, S., Chen, J., Wu, M., Chen, H., Kato, N., and Yuan, Z. (2010). Hepatitis B virus polymerase inhibits  
 717 RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through  
 718 interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between  
 719 TBK1/IKKepsilon and DDX3. *J Gen Virol* 91, 2080-2090.  
 720 Zlotnick, A., and Mukhopadhyay, S. (2011). Virus assembly, allostery and antivirals. *Trends in*  
 721 *Microbiology* 19, 14-23.  
 722

Figures and figure legends

Figure 1



**Figure 1. HBc protein is the viral determinant involved in the early inhibition of IFN responses in hepatocytes.** Proliferative HepaRG cells were lipo-transfected for 4 hours with low (A) or high (B) amounts of mock, complete HBV inoculum, nucleocapsids or recombinant HBcAg (100 or 1000 vge/cell and HBcAg at 50 or 500 pg/cell) prior Poly(I:C) stimulation (4h). Expression of innate immunity genes (IFN- $\beta$ , IL-29, OAS-1 and IL-6) was analyzed by RTqPCR and compared to the mock control normalized to 100%. (C) Differentiated HepaRG-TR-HBc and HepaRG-TR-T7 cells were treated or not for 24h with tetracycline (TET, 10  $\mu$ g/ml) prior stimulation with Poly(I:C) ligand for 4h. Expression of innate immunity genes (IFN- $\beta$ , IL-29, OAS-1 and IL-6) was analyzed by RTqPCR and compared to the non-TET-treated cells normalized to 100%. (D) IL-6 cytokine gene expression, and (E) protein secretion were analyzed by RTqPCR and ELISA respectively in differentiated HepaRG-TR-HBc cells treated or not for 24h with tetracycline (10  $\mu$ g/ml) prior stimulation with several TLRs ligands (TLR2, Pam3CSK4; TLR3, Poly(I:C); RIGI/MDA5, Iyovec-Poly(I:C); TLR4, LPS; TLR5, Flagellin; TLR6, FSL1; TLR7/8, ssRNA40) for 4 hours and compared to the non-tetracycline stimulated HepaRG-TR-HBc cell line normalized to 100%.

Figure 2

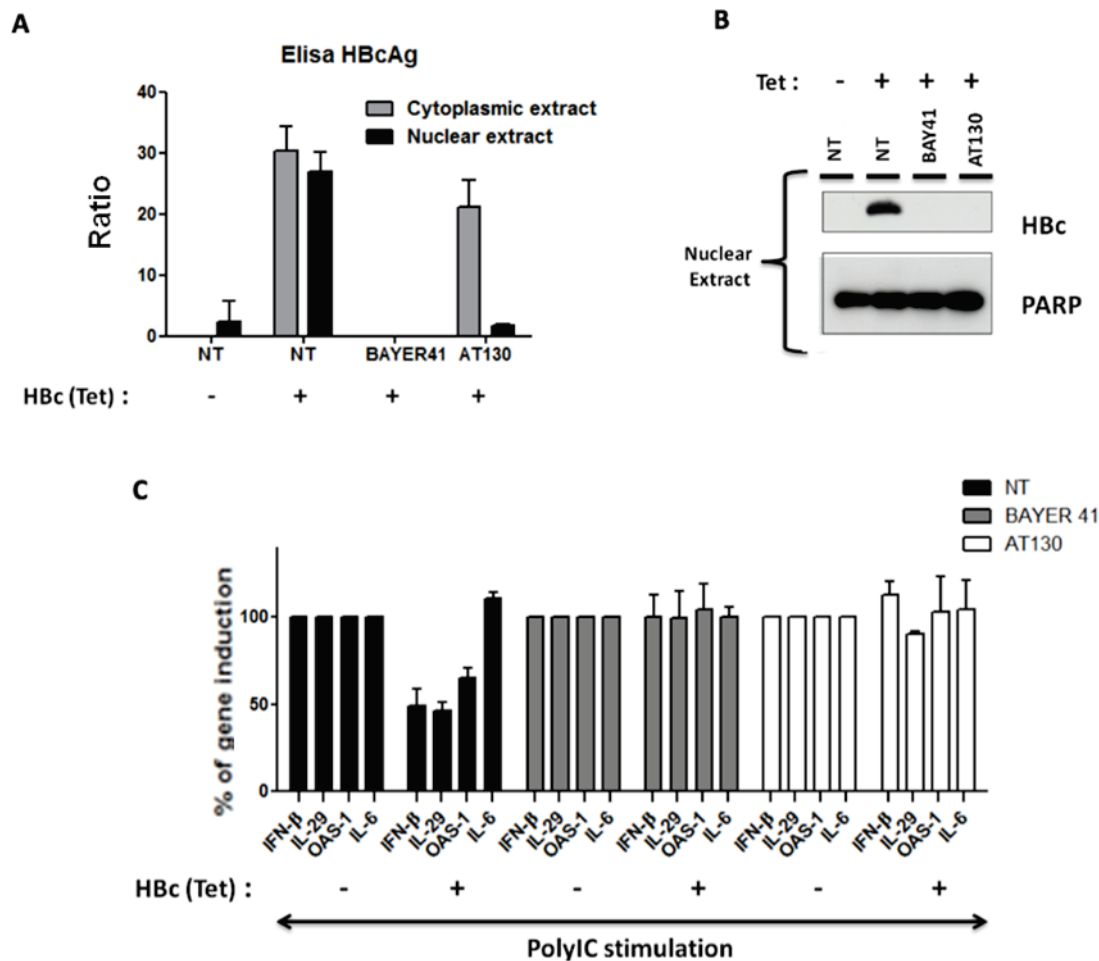
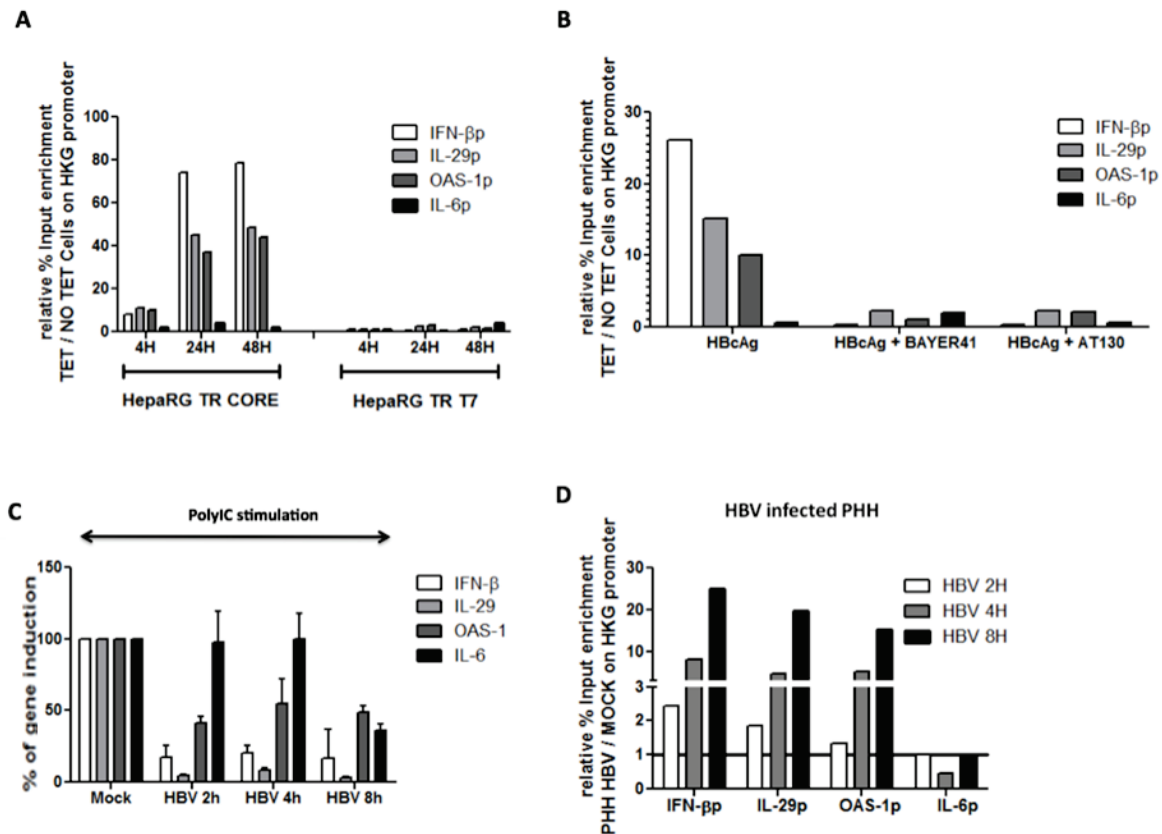


Figure 2: Anti-capsids treatments reverts the inhibitory effect mediated by HBc protein.

(A and B) Differentiated HepaRG-TR-HBc cells were treated or not for 72h with Bayer41 (1 $\mu$ M) or AT130 (3 $\mu$ M) prior stimulation with tetracycline (2  $\mu$ g/ml) for 24h. Nuclear and cytoplasmic protein extract from differentiated HepaRG-TR-HBc cells stimulated with tetracycline (10  $\mu$ g/ml) for 24h were extracted and HBcAg were evaluated by ELISA (A) and western blot (B) using home-made anti-HBc antibody, anti-PARP (nucleus marker), and anti-tubulin (cytoplasmic marker) antibodies. (C) Differentiated HepaRG-TR-HBc cells were treated or not for 72h with Bayer41 (1  $\mu$ M) or AT130 (3  $\mu$ M) prior to be stimulated with tetracycline for 24h (2 $\mu$ g/ml) and then treated with Poly(I:C) ligand for 4h. Expression of innate immunity genes (IFN- $\beta$ , IL-29, OAS-1 and IL-6) was analyzed by RTqPCR and compared to the non-tetracycline stimulated HepaRG-TR-HBc cells normalized to 100%.

**Figure 3**

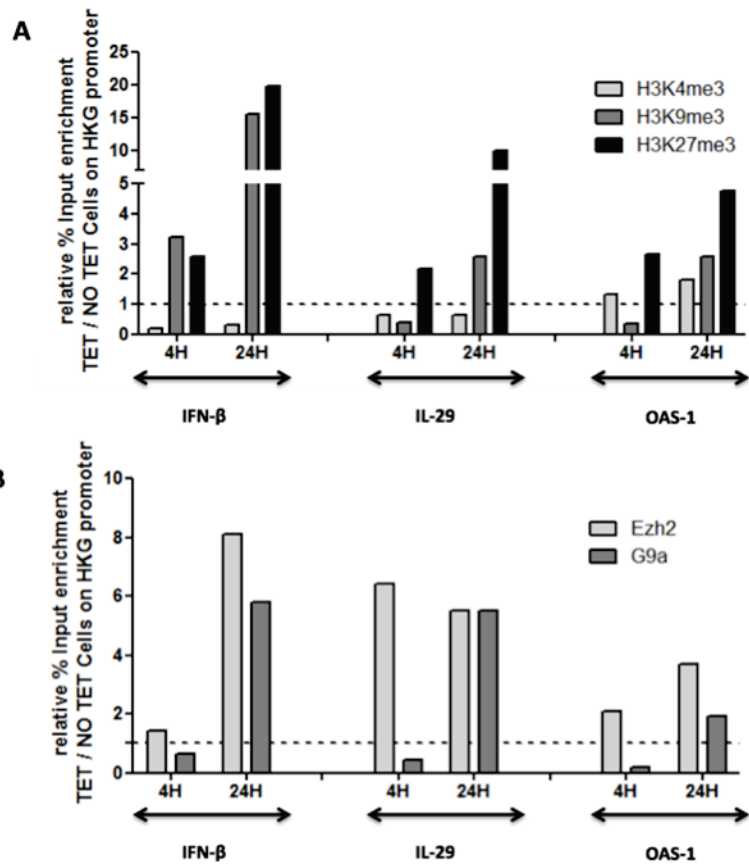


**Figure 3: Hbc protein interacts rapidly with innate gene promoters to inhibit IFN responses in hepatocytes.**

(A) Differentiated HepaRG-TR-Hbc and HepaRG-TR-T7 cells were treated for 4h, 24h and 48h with tetracycline (10  $\mu$ g/ml) and ChIP-qPCR was performed with home-made anti-Hbc and specific primers on IFN- $\beta$ p, IL-29p, OAS-1p and IL-6p. (B) Differentiated HepaRG-TR-Hbc cells were treated or not for 72h with Bayer41 (1  $\mu$ M) or AT130 (3  $\mu$ M) prior to be stimulated with tetracycline (2  $\mu$ g/ml) for 24h and ChIP-qPCR was performed with home-made anti-Hbc and specific primers on IFN- $\beta$ p, IL-29p, OAS-1p and IL-6p. The percentage of input enrichment was normalized on the non-tetracycline stimulated HepaRG-TR-Hbc cells and on GAPDHp. (C) PHHs were inoculated with the mock HBV or the complete HBV inoculum for 2h, 4h and 8h prior to be stimulated with Poly(I:C) ligand for 4h. Expression of innate immunity genes (IFN- $\beta$ , IL-29, OAS-1 and IL-6) were analyzed by RTqPCR and compared to the mock HBV inoculated PHH normalized to 100%. PHH were infected with a complete HBV inoculum for 2h, 4h and 8h, and ChIP-qPCR was performed with home-made anti-Hbc and specific primers on IFN- $\beta$ p, IL-29p, OAS-1p and IL-6p. The percentage of input enrichment was normalized to the non-infected PHH and on GAPDHp. Results are representative of 3 independents experiments. (D) PHH were infected with a complete HBV inoculum for 2h, 4h and 8h, and ChIP-qPCR was performed with home-made anti-Hbc and specific primers on IFN- $\beta$ p, IL-29p, OAS-1p and IL-6p. The percentage of input enrichment was normalized to the non-infected PHH and on GAPDHp. Results are representative of 3 independents experiments.



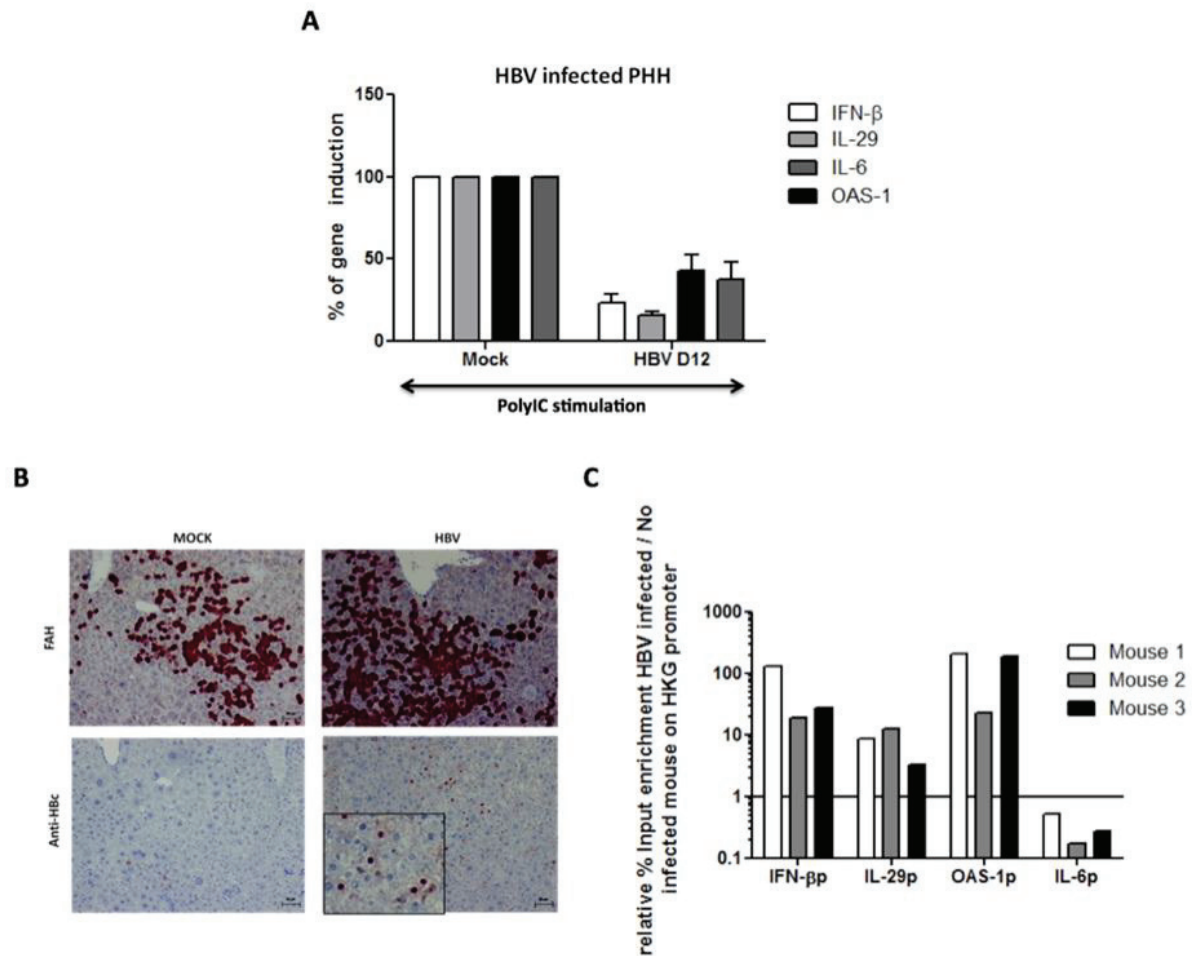
**Figure 4**



**Figure 4: HBc affects the epigenetic state of host genes to control innate immunity in hepatocytes.** (A) Differentiated HepaRG-TR-HBc cells were treated for 4h and 24h with tetracycline (10μg/ml) and histone modifications on IFN-βp, IL-29p and OAS-1p were assessed by ChIP-qPCR using anti-H3K4me3, anti-H3K9me3 or anti-H3K27me3 antibodies. The percentage of input enrichment was normalized to the non-tetracycline stimulated HepaRG cell lines and on GAPDHp. Results are representative of 3 independents experiments. (B) Differentiated HepaRG-TR-HBc cells were treated for 4h and 24h with tetracycline (10 μg/ml) and recruitment of histone methylases on IFN-βp, IL-29p and OAS-1p were assessed by ChIP-qPCR using anti-Ezh2 and anti-G9a antibodies. The percentage of input enrichment was normalized on the non-tetracycline stimulated HepaRG cell lines and on GAPDHp. Results are representative of 3 independents experiments

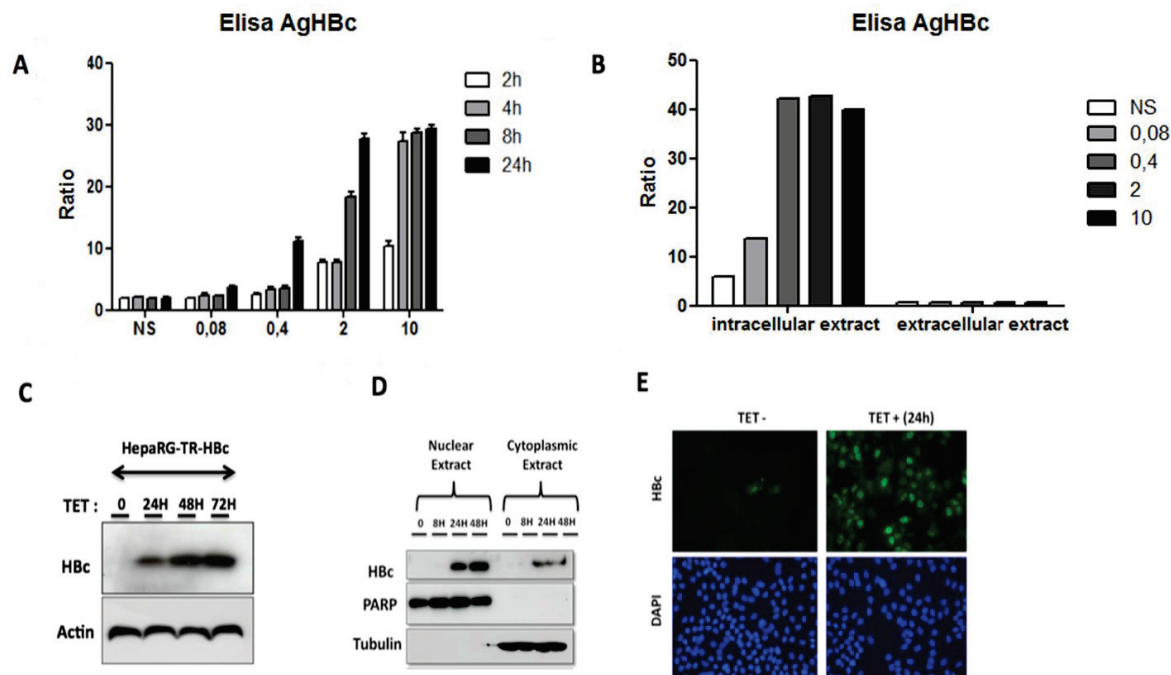


**Figure 5**



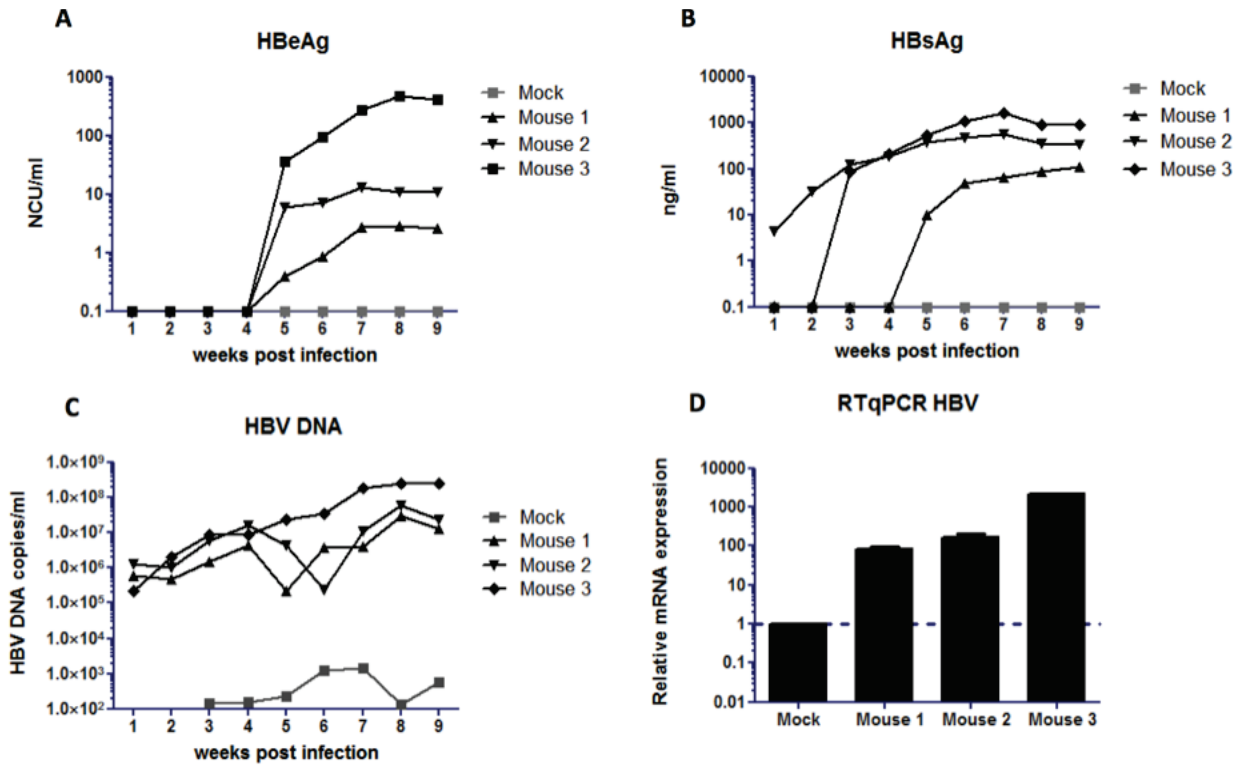
**Figure 5: Long term inhibition of Hepatocyte innate response by HBV core protein.**

(A) PHHs were infected with a completed HBV inoculum for 12 days and then stimulated with poly(I:C) ligand for 4h. Expression of innate immunity genes (IFN- $\beta$ , IL-29, OAS-1 and IL-6) was analyzed by RTqPCR and compared to the non-infected PHH normalized to 100%. (B) Liver-humanized mice were infected with a complete HBV inoculum and sacrificed, with recovery of liver pieces into nitrogen or formaldehyde, when the replication was at its maximum (as determined by monitoring of viremia and antigenemia (**Supple Fig.2**)) after 9 weeks. Immunohistostaining was performed on paraffin embedded liver samples with anti-HBc (Dako) and human-specific anti-FAH (Cliniscience) antibodies. (C) ChIP-qPCR was performed using these mice samples with the home-made anti-HBc and specific primers on IFN- $\beta$ p, IL-29p, OAS-1p and IL-6p. The percentage of input enrichment was normalized to the non-infected mice and on GAPDHp.



Suppl. Fig. 1. Core expression in the inducible HepaRG-TR-HBc cells.

(A) Intracellular expression of HBcAg was analysed by ELISA in differentiated HepaRG-TR-HBc cells following treatment with several dose of tetracycline (TET 0,08 µg/ml, 0,4 µg/ml, 2 µg/ml and 10 µg/ml) for 2h, 4h, 8h and 24h. (B) Intra- and extracellular expression of HBcAg were quantified by ELISA in differentiated TET-treated HepaRG-TR-HBc cells for 72h. (C) HBcAg expression in differentiated HepaRG-TR-HBc cells stimulated with tetracycline (10 µg/ml) for 24h, 48h and 72h was also analyzed by western blotting (WB) with anti-HBc and anti-actin antibodies. (D) HBcAg protein was quantified by WB in nuclear and cytoplasmic extracts of differentiated HepaRG-TR-HBc cells following TET treatment for 8-24-48h. (E) HBcAg sub-localization in differentiated HepaRG-TR-HBc cells stimulated with tetracycline (10 µg/ml) for 24h was assessed by immunofluorescence with an anti-HBc antibody (Abcam, 8637) and cell nucleus was stained by Hoescht reagent.



Suppl. Fig. 2. FRG humanized mouse model is permissive to HBV infection.

FRG liver-humanized mice were infected with  $5.10^8$  veg of HBV (or PBS 1X) and sera were harvested every week to follow-up antigenemia by Elisa: (A) HBeAg and (B) HBsAg secretion. (C) Viral DNA was extracted from sera to perform HBV qPCR. (D) Total RNA was extracted from liver samples obtained at sacrifice and intrahepatic HBV RNA level was assessed by RT-qPCR.

**Tables**

**Table 1. Primer pairs for RT-qPCR**

GENE	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<b>β-actin</b>	TGGCATTGCCGACAGGATGC	TCTGCTGGAGGTGGACAGCGA
<b>RPLPO</b>	CACCATTGAAATCCTGAGTGATGT	TGACCAGCCCAAAGGAGAAG
<b>IFN-β</b>	GCCGCATTGACCATGTATGAGA	GAGATCTTCAGTTTCGGAGGTAAC
<b>IL-29</b>	GTGACTTTGGTGCTAGGCTTG	GCCTCAGGTCCCAATTCCC
<b>OAS-1</b>	AGGTGGTAAAGGGTGGCTCC	ACAACCAGGTCAGCGTCAGAT
<b>IL-6</b>	ACCCCTGACCCAACCACAAAT	AGCTGCGCAGAATGAGATGAGTT

**Table 2. Primer pairs for ChIP-qPCR**

GENE	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<b>GAPDH<sub>p</sub></b>	CTTCTCCCCATTCCGTCTTC	CCCCAGCTACAGAAAGGTCA
<b>IFN-β<sub>p</sub></b>	CTTTCGAAGCCTTTGCTCTG	CAGGAGAGCAATTTGGAGGA
<b>IL-29<sub>p</sub></b>	GCCCAGGGAGTTCTAAGGAT	CTGATGAGGGAACAGGTGTG
<b>OAS-1<sub>p</sub></b>	TGAAATTCAGCACTG GGATCAC	GGAGGAGCTGTCTTTGCACTT
<b>IL-6<sub>p</sub></b>	GCCCAGGGAGTTCTAAGGAT	CTGATGAGGGAACAGGTGTG

# **DISCUSSION**

## ***I-DISCUSSION DE L'ETUDE 1***

Au laboratoire, en plus des hépatocytes primaires humains, nous avons accès aux cellules HepaRG, qui sont des cellules progénitrices du foie, non transformées, capables de se différencier en cellules hépatocytaires, et infectable par le virus de l'hépatite B (Hantz, Parent et al. 2009). Afin de pouvoir étudier la réponse antivirale innée dans ces cellules en réponse à l'infection par le virus HBV, il était indispensable dans un premier temps de déterminer si les principaux senseurs de l'immunité innée (TLRs et RLRs) étaient exprimés et fonctionnels. Nous avons ainsi eu la possibilité de comparer l'expression de ces senseurs dans les cellules HepaRG, à celle des hépatocytes primaires humains (PHH), afin de valider, *in fine*, la lignée HepaRG comme un modèle alternatif de cellules immunocompétentes, comparable aux PHH.

Dans cette première étude, nous avons pu montrer que cette lignée conservait la capacité de répondre à un panel de ligand de PRRs (ADN sb, ARN sb, ARN db, motifs bactériens...) pour initier un programme antiviral. Par conséquent, cette lignée représente un modèle pertinent, pour étudier les interactions entre le virus HBV et l'immunité innée hépatocytaire, contrairement aux lignées d'hépatomes, transformées et souvent déficientes pour les voies de signalisation intracellulaires nécessaires à la mise en place d'une réponse innée fonctionnelle (Alexopoulos, Saez-Rodriguez et al. 2010).

Plus précisément, nous avons pu montrer que les ARNm de tous les TLRs, de RIG-I et de MDA5 étaient exprimés dans les cellules HepaRG. De façon intéressante, le profil d'expression de chaque senseur dans les cellules HepaRG différenciées est très similaire à celui retrouvé dans les PHH, avec en particulier une expression plus forte des senseurs TLR8 et une expression plus faible des senseurs TLR7 et 10 dans les deux modèles cellulaires étudiés. Par ailleurs, au sein du modèle HepaRG, le niveau d'expression des senseurs semble être identique dans les cellules biliaires et les cellules hépatocytaires après différenciation sous l'effet du DMSO. L'expression de chacun des TLRs en cellules HepaRG et en PHH a également pu être confirmée au niveau protéique. Les senseurs TLR3, -4, -5, -7, -8 et -9 semblent finalement être les plus fortement exprimés, suggérant ainsi une régulation post-transcriptionnelle ou traductionnelle des ARNm des TLRs. Même si les senseurs TLR7 et 9 sont majoritairement exprimés dans les pDCs et les lymphocytes B chez l'homme, il a cependant déjà été reporté que TLR7 et TLR9, dans un contexte inflammatoire, pouvaient être faiblement détectés sur d'autres types cellulaires, incluant les hépatocytes (Lee, Wu et

al. 2006). Cependant, les senseurs TLR7 et TLR9 sembleraient jouer un rôle mineur dans les hépatocytes, en comparaison avec les pDCs en termes de sécrétions cytokiniques des IFN de type I ou d'IL-6.

Les RLRs, RIG-I et MDA5, sont également détectés au niveau protéique et sont hautement inductibles sous l'effet de l'IFN- $\alpha$ . Chacun des PRRs serait en effet capable d'être induit au niveau ARN par son propre ligand prototypique, à l'exception de TLR6 et TLR9. Parallèlement, ces stimulations prototypiques peuvent également induire l'expression et la sécrétion de la cytokine IL-6, à l'exception de la stimulation des senseurs TLR7 et TLR9. En outre, les senseurs TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I et MDA5 induisent l'expression des ARNm de l'IFN- $\alpha$  et de l'IFN- $\beta$ , ce qui démontre que tous les TLRs et les senseurs RIG-I et MDA5, exprimés dans les cellules HepaRG différenciées, sont plus ou moins fonctionnels. Les cytokines IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  n'ont cependant été détectées que dans le surnageant des cellules stimulées par les ligands prototypiques de RIG-I et MDA5.

Nos résultats démontrent finalement que, contrairement aux cellules d'hépatome, la lignée HepaRG possède un profil d'expression des senseurs similaires aux hépatocytes primaires humains. Par ailleurs, suivant la stimulation par leur propre ligand prototypique, les PRRs sont capables d'activer une cascade de signalisation permettant la sécrétion de cytokines IFN de type I/III et proinflammatoires dans le surnageant des cellules, et *in fine* la mise en place d'un programme antiviral.

Cette étude valide ainsi l'utilisation de la lignée HepaRG pour l'étude des réponses innées hépatocytaires dans le cadre d'une infection par un virus hépatotrope, sans interférence avec d'autres cellules de types immunitaires ou endothéliales. La lignée immunocompétente HepaRG représente également un modèle pertinent pour développer des stratégies immunothérapeutiques anti-HBV basées sur l'utilisation d'agonistes de PRRs.

## ***II-DISCUSSION DE L'ETUDE 2***

Dans un contexte infectieux non-physiologique, nous avons pu observer jusqu'à présent que les cellules HepaRG étaient capables de détecter le virus HBV dans un modèle de transduction expérimentale d'un baculovirus contenant le génome HBV (Bac-HBV) (Lucifora, Durantel et al. 2010). Cette détection était caractérisée par une très forte réponse antivirale (activation de la réponse IFN et induction des ISGs associés), qui permet de contrôler efficacement la réplication du virus dans les cellules transduites par le Bac-HBV.

Dans cette seconde étude, *via* l'utilisation des cellules HepaRG et des PHH, nous nous sommes intéressés aux événements cellulaires et virologiques précoces responsables de la persistance ou de la « clairance » virale du virus de l'hépatite B.

Nous avons tout d'abord pu mettre en évidence que, contrairement à la transduction baculovirale HBV, l'infection des hépatocytes avec un inoculum complet HBV (AgHBs, AgHBe, Pol et AgHBc) n'induit qu'une activation faible et transitoire (24h) de l'immunité innée dans les cellules HepaRG et les hépatocytes primaires humains. Par ailleurs, cette activation abortive de l'immunité innée, dans ce contexte expérimental, aboutit à la persistance de l'infection, contrairement à la « clairance » virale obtenue dans le modèle de transduction du génome HBV (Lucifora, Durantel et al. 2010). En effet, la vectorisation du génome HBV (dépourvue des protéines AgHBs, AgHBe, Pol et AgHBc de l'inoculum) induit une forte réplication synchronisée, associée à une importante production d'intermédiaires de réplication, conduisant à l'activation de la réponse innée hépatocytaire et, *in fine*, à la mise en place d'un état antiviral dans les hépatocytes comme précédemment décrit par Lucifora *et al.* (Lucifora, Durantel et al. 2010).

D'autre part, nous avons montré dans la première partie de cette seconde étude que la transduction baculovirale induisait une augmentation significative de l'expression de TLR2, -3, -7 et RIGI/MDA5 alors qu'une infection naturelle par le virus HBV induisait faiblement mais significativement l'expression des senseurs TLR2, -4, -8 et -9. Si nous considérons qu'il existe un système de rétrocontrôle positif de l'expression des senseurs PRRs induits après leur stimulation par un ligand prototypique, il est alors possible d'imaginer que les récepteurs TLR2, -4, -8 et -9 puissent être impliqués dans la reconnaissance du virus HBV lors de son entrée dans la cellule, dans un contexte naturel d'infection. D'un autre côté, lors de la transduction baculovirale du génome HBV, la forte production des intermédiaires de réplication notamment l'ARNpg majoritairement produits à 24h, pourrait laisser supposer que cet intermédiaire de réplication pourrait être un PAMP potentiel du virus HBV détecté par les senseurs à ARN (TLR3, -7, RIGI/MDA5), qui coïnciderait également avec le pic d'activation de l'immunité innée. Il serait donc très intéressant de mettre en évidence les senseurs hépatocytaires (PRRs) responsables de la reconnaissance directe du virus, des effecteurs antiviraux (ISGs) aux déterminants viraux (PAMPs) spécifiquement reconnus au cours de l'infection par HBV. Des études complémentaires, utilisant par exemple des siRNA ou des antagonistes inhibant les voies de signalisation des PRRs, seront nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

Dans la deuxième partie de cette étude nous avons clairement démontré que la réponse innée hépatocytaire est activement inhibée dès 24h post-infection par l'inoculum complet HBV. En particulier nous avons montré que le virus était capable de cibler spécifiquement la réponse immune induite par le poly(I :C) (*via* l'activation de TLR3,

RIGI/MDA5). De plus, dès 2h d'inoculation par le virus suivie de la stimulation de la réponse innée des hépatocytes infectés, nos résultats montrent que le virus est capable d'induire très précocement un état d'immunosuppression en inhibant les réponses IFN de type I et III (IFN- $\beta$ , IL-29), la voie proinflammatoire (IL-6) et l'expression des ISGs (OAS1). Pour la première fois, dans un contexte d'infection naturelle par le virus HBV, nous avons pu démontrer une inhibition active et précoce des voies de signalisation médiées par l'activation des senseurs à ARN double brins (TLR3, RIG-I et MDA5).

Ces résultats pourraient expliquer la faible réponse innée observée dans la cinétique précoce d'infection par le virus, ainsi que l'absence de réponse inflammatoire durant la phase de persistance de l'infection dans notre modèle. Ces résultats peuvent aussi expliquer pourquoi HBV était qualifié de virus silencieux quand les cinétiques d'analyse étaient trop tardives (supérieures à 24h) (Wieland, Thimme et al. 2004). De façon intéressante, le virus HBV inhibe spécifiquement et très précocement l'activation de l'immunité innée médiée par les senseurs à ARN double brins (TLR3, RIG-I et MDA5). D'un point de vue évolutif, on peut imaginer que cette stratégie d'inhibition précoce de la réponse antivirale pourrait précéder la reconnaissance virale par la cellule hôte, et permettre ainsi au virus de bloquer la détection de ces propres intermédiaires ARN, dont l'ARNpg, PAMPs potentiels du virus. Au vu de ces résultats, nous avons ainsi pu démontrer que le virus HBV n'était finalement pas un virus invisible pour les hépatocytes mais plutôt un inhibiteur efficace des réponses innées hépatocytaires qui pourrait faciliter la persistance de l'infection dans les hépatocytes.

Plus particulièrement, nous avons pu montrer que les déterminants viraux déjà présents dans l'inoculum (AgHBs, AgHBe, AgHBc et polymérase) étaient responsables de l'inhibition de l'immunité innée ce qui pouvait expliquer sa précocité. Ainsi, après inoculation des cellules HepaRG par les divers composants viraux purifiés de l'inoculum HBV (les particules infectieuses, les particules subviraux (AgHBs) et l'AgHBe soluble), nous avons finalement pu mettre en évidence que chacune de ces particules virales étaient capable de bloquer l'activation de la réponse innée hépatocytaire de façon très précoce suivant l'infection. Cette inhibition semble ainsi dissociée de la réplication. Il n'est cependant pas exclu que les protéines virales néosynthétisées lors de la réplication, telles la protéine HBx ou la forme P22 intracellulaire de l'AgHBe, puissent ensuite être impliquées dans l'amplification ou le maintien de l'inhibition à des stades plus tardifs (Wang and Ryu 2010; Wu, Kanda et al. 2012). En effet, la dégradation d'IPS-1 *via* la protéine HBx, ou l'interaction avec les facteurs Mal, TRAM, RIPK2 avec la protéine P22 permettrait au virus HBV de mettre en place diverses stratégies pour inhiber l'immunité innée lors des différentes étapes de sa réplication.

De façon intéressante, nous avons pu démontrer que des particules infectieuses isolées (contenant l'AgHBs, l'AgHBc et la Polymérase) étaient capables de bloquer de façon



précoce et spécifique la réponse IFN de type I au sein de l'hépatocyte, alors que l'AgHBs et l'AgHBe inhibaient plus particulièrement la réponse proinflammatoire (IL-6). Des études approfondies ont été nécessaires pour mieux comprendre cette spécificité d'inhibition de la réponse IFN portée par la particule infectieuse seule. Des études utilisant des modèles artificiels de transfection de plasmides, codant HBV ou les protéines virales dans des lignées d'hépatomes, avaient permis de montrer que la polymérase et la protéine de capsidie pouvaient être des facteurs viraux inhibiteurs potentiels (Whitten, Quets et al. 1991; Wang and Ryu 2010). En effet, la polymérase pourrait interagir avec DDX3 pour bloquer l'activation de la signalisation IRF-dépendante, tandis que la protéine de capsidie pourrait interagir avec le promoteur du gène IFN- $\beta$  pour inhiber son expression. De façon intéressante, l'interaction entre la protéine HBc et les promoteurs de l'hôte a pu être démontrée récemment (Guo, Kang et al. 2012). La protéine de capsidie serait donc capable de se fixer sur l'ADN au niveau des régions promotrices et de réguler l'expression des gènes.

Peu d'études sur la modulation de l'immunité innée ont finalement pu être réalisées dans la phase aigüe d'infection. Cependant, dans une étude récente, Wu *et al.* ont également pu démontrer une inhibition des voies IFN de type I et proinflammatoire, dépendantes de TLR3, après inoculation d'hépatocytes primaires murins, de cellules de Kupffer et de cellules endothéliales, par un inoculum viral HBV produit dans une lignée murine (cellules HBV-Met) (Wu, Meng et al. 2009). Néanmoins, les hépatocytes murins n'étant pas permissifs à l'infection, aucune analyse sur les conséquences de la réplication du virus HBV n'a pu être réalisée. Par ailleurs, cette étude montre également une inhibition des voies TLR4, -7 et -9 contrairement à nos résultats, ce qui suggère une différence de profil d'inhibition selon l'origine du modèle utilisé (humain vs murin).

Enfin, notre étude repose principalement sur le modèle hépatocytaire HepaRG, ce qui n'exclut pas que les mêmes mécanismes d'inhibition, ou d'autres, pourraient être mis en place par le virus HBV pour contrecarrer l'activation de l'immunité innée dans d'autres types cellulaires humains. En particulier, pour se propager au sein de l'organisme, le virus HBV aurait également développé des stratégies d'échappement à la détection par les cellules immunitaires de l'hôte. L'AgHBs jouerait un rôle majeur en inhibant l'activation des macrophages et des cellules dendritiques (Oquendo, Karray et al. 1997; Xu, Hu et al. 2009). Les motifs CpG du génome viral pourrait également inhiber l'activation de la signalisation IRF7 dans les pDCs (Vincent, Zannetti et al. 2011).

Des études supplémentaires sont finalement requises pour identifier le mécanisme moléculaire d'inhibition, nécessaire au contrôle de la réponse antivirale et à l'établissement de l'infection, pour chacun de ces déterminants viraux (particule infectieuse, AgHBs et AgHBe). La compréhension des relations mises en jeu précocement entre le virus HBV et les

cellules du foie (parenchymateuses et non-parenchymateuses) permettra ainsi de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les mécanismes d'échappement du virus HBV.

### ***III-DISCUSSION DE L'ETUDE 3***

Beaucoup de virus ont mis en place des stratégies immunomodulatrices afin d'établir leur infection et de se propager au sein de l'organisme. Parmi eux, le virus de l'hépatite B aurait développé de nombreux mécanismes d'échappement, particulièrement efficaces, pour établir une infection chronique *via* l'action immunosuppressive de ses différentes protéines virales (AgHBs, AgHBe, AgHBx, AgHBc et polymérase). Dans cette troisième étude, nous avons ainsi pu mettre en évidence que le déterminant viral essentiel à l'inhibition précoce des réponses IFN de type I et III, nécessaire à l'établissement d'une infection persistante *in vitro*, était l'AgHBc présent dans la capside des virions entrants. Plus particulièrement, nous avons pu élucider le mécanisme impliqué, à savoir, l'interaction entre HBc et les promoteurs des gènes de l'immunité innée, ainsi que la modification de leur profil d'expression par régulation négative de leur statut épigénétique.

Pour se faire, nous avons utilisé divers outils, tels que les nucléocapsides non enveloppées et de l'AgHBc recombinant (produit en levures), que nous avons transfecté (lipo-transfection) dans les cellules HepaRG pour permettre leur entrée dans la cellule (Rabe, Glebe et al. 2006), avant de les stimuler par un ligand spécifique de TLR3 pour mettre en évidence l'interférence de la protéine de capside avec l'immunité innée hépatocytaire. Nous avons ainsi pu montrer que l'AgHBc était nécessaire et suffisant pour inhiber, dès 4h d'incubation, la mise en place d'un état antiviral dans les cellules, en inhibant l'expression des gènes IFN- $\beta$ , IL-29 et OAS-1. Par ailleurs, nous avons également construit la lignée HepaRG-TR-HBc, surexprimant l'AgHBc de façon inducible par la tétracycline, pour confirmer nos résultats précédents, et renforcer le concept d'inhibition précoce des réponses IFN médiée par la protéine de capside.

Par ailleurs, des études ont montré que la polymérase virale pouvait inhiber l'expression du gène IFN- $\beta$  dans des cellules d'hépatome (Wang and Ryu 2010). Dans notre étude, aucune différence entre le niveau d'inhibition de la réponse IFN médié par les nucléocapsides et par l'AgHBc recombinant n'a cependant été observée. Il semblerait ainsi que, dans notre contexte expérimental, la polymérase du virus HBV ne soit pas impliquée dans la répression de l'état antiviral observée dans les cellules HepaRG. Ces différences peuvent ainsi être expliquées par le fait que la stœchiométrie entre les protéines HBc et polymérase, retrouvée naturellement dans les virions HBV, ait été conservée du fait de l'utilisation de nucléocapsides purifiées, ainsi que par la plus faible quantité d'unité de

polymérase délivrée, *in fine*, dans les hépatocytes. Par ailleurs, la divergence de nos résultats pourrait également être la conséquence de l'utilisation d'un modèle plus pertinent, la lignée immunocompétente HepaRG (étude 1), et ceci contrairement aux lignées issues d'hépatome utilisées par Wang *et al.* (Wang and Ryu 2010).

De façon intéressante, l'activation de la réponse inflammatoire, avec l'expression de la cytokine IL-6, ne semble pas être ciblée par la protéine de capsid. De plus, dans les PHH infectés par un inoculum HBV complet, nous avons pu confirmer que le virus pouvait induire une répression précoce de la réponse IFN (dès 2h d'infection), suivie d'une répression plus tardive de la réponse inflammatoire IL-6 (après 8h d'infection). Ce différentiel témoigne ainsi de la mise en place de deux mécanismes d'inhibition successifs médiés par le virus HBV, pouvant être portés par des antigènes viraux différents. Comme déjà décrit précédemment (étude 2), ainsi que dans d'autres études (Visvanathan, Skinner et al. 2007; Wu, Meng et al. 2009), les protéines HBs et HBe pourraient être impliquées dans l'inhibition de l'expression de la cytokine proinflammatoire IL-6.

Une corrélation étroite entre la localisation cellulaire de la protéine HBc et le stade de l'infection avait auparavant été décrite dans plusieurs études. Plus particulièrement, lors de la phase de tolérance-immune, la protéine de capsid serait majoritairement retrouvée dans le noyau des hépatocytes infectés (Figure 30). Au contraire, lors du réveil du système immunitaire accompagné de la lyse des hépatocytes infectés et de la diminution de la charge virale, la localisation de l'AgHBc serait d'avantage cytoplasmique (Naoumov, Portmann et al. 1990).

D'anciennes études, en cellules d'hépatome, avaient également démontré que la protéine de capsid pouvait interagir avec les promoteurs des gènes IFN- $\beta$  et MxA pour inhiber leur expression ce qui suggérerait un rôle inhibiteur d'HBc dans la fraction nucléaire de la cellule infectée (Whitten, Quets et al. 1991; Rosmorduc, Sirma et al. 1999). De ce fait, *via* l'utilisation des composés anticapsides BAYER-41 et AT-130, permettant de dégrader la protéine HBc ou d'inhiber sa translocation nucléaire respectivement, nous avons pu mettre en évidence que la protéine de capsid pouvait jouer son rôle immunomodulateur au niveau du noyau dans la lignée HepaRG-TR-HBc. En effet, l'utilisation des anticapsides, avec en particulier l'AT-130 qui induit un blocage de la translocation nucléaire de la protéine HBc, nous a permis de reverser le phénotype d'inhibition médié par l'AgHBc.

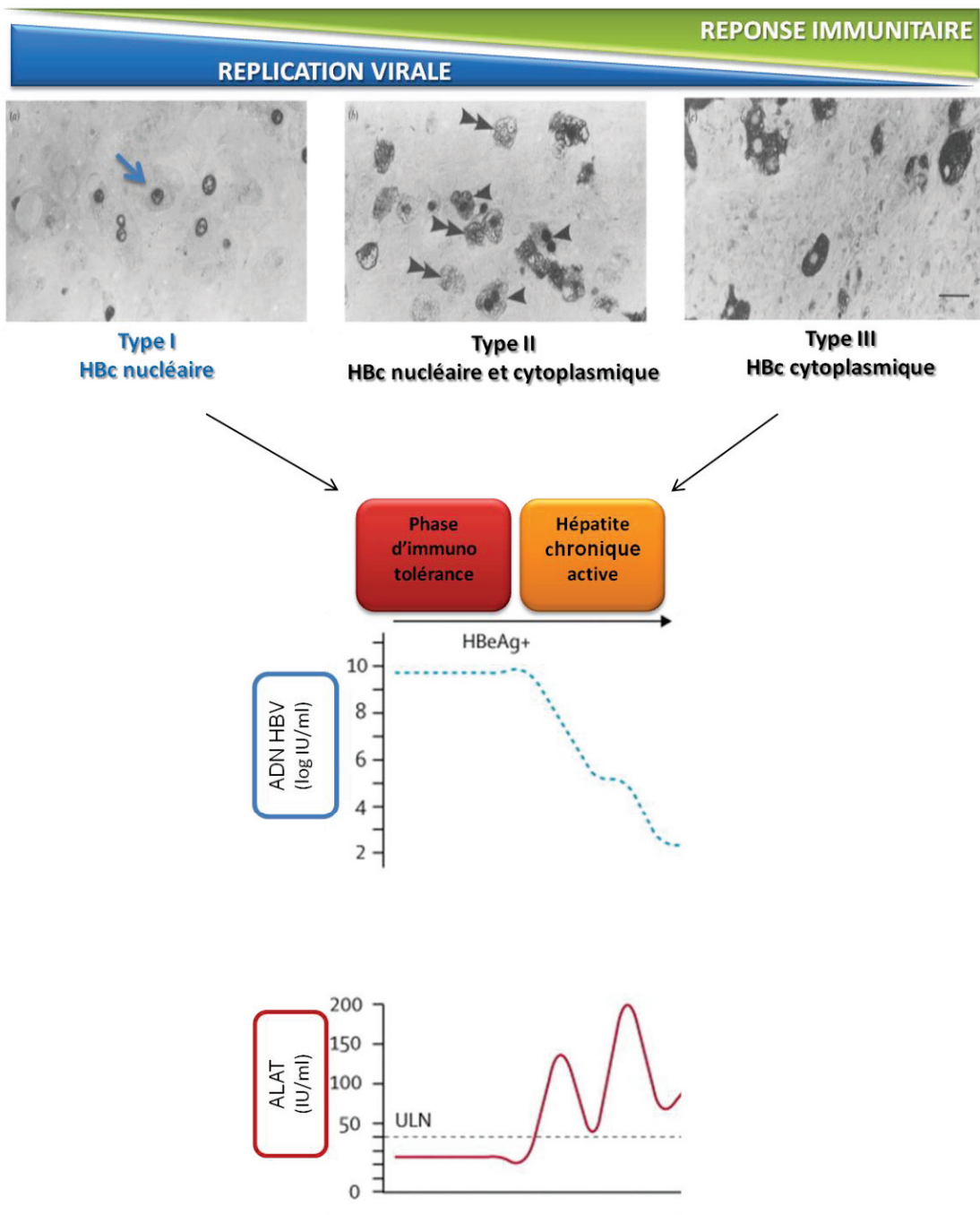


FIGURE 30: CORRELATION ENTRE LOCALISATION CELLULAIRE DE LA PROTEINE HBC ET LA REPONSE IMMUNITAIRE (ADAPTEE DE PAPATHEODORIDIS 2008 ET AKIBA 1987)

La phase aigüe est suivie de la phase d'immunotolérance, caractérisée par une réplication virale élevée et une faible activité des ALAT, associée à une localisation nucléaire de la protéine HBC. L'activité des ALAT augmente et la virémie diminue lors de la phase de séroconversion AgHBe-Ac anti-HBe. Lors de cette phase, la protéine HBC est retrouvée majoritairement dans le compartiment cytoplasmique.

Plus particulièrement, l'activité transcriptionnelle des gènes peut être régulée par des modifications épigénétiques incluant des méthylations de l'ADN et des régulations post-traductionnelles des histones (PTMs), répondant, *in fine*, à un « code » de répression ou d'activation des gènes : le code épigénétique (Marx 2012). Ainsi, l'activation de l'immunité innée, et en particulier la transcription du gène IFN- $\beta$ , implique le recrutement de plusieurs facteurs de transcription (IRF3, NFkB et ATF2/cJun) constituant l'enhanceosome au niveau de sites consensus présents sur les promoteurs (Apostolou and Thanos 2008). Par ailleurs, des modifications post-traductionnelles des histones, telles que l'acétylation de l'histone 3 (lysines 9 et 14), de l'histone 4 (lysine 8) et la dé-diméthylation de l'histone 3 (lysine 9), sont également nécessaires pour permettre l'ouverture de la chromatine et son accessibilité au complexe de réplication (Agalioti, Chen et al. 2002; Genin, Lin et al. 2012).

De façon intéressante, nous avons également pu démontrer que l'AgHBc pouvait moduler le statut épigénétique des histones associées aux promoteurs des gènes IFN- $\beta$ , IL-29 et OAS-1. En effet, la protéine HBc induit l'hyperméthylation de certains résidus lysines de l'histone 3 (H3K9me3 et H3K27me3), conduisant à une conformation « fermée » de la chromatine, verrouillant ainsi l'activité transcriptionnelle des gènes de l'hôte, et ceci *via* le recrutement d'histone methyl-transferases, G9a et Ezh2. De plus, nos résultats ont également montré que la modification activatrice H3K4me3 diminuait, ou bien était stable, au niveau des promoteurs IFN- $\beta$ p et IL-29p dans le modèle HepaRG-TR-HBc, témoignant de la profonde réorganisation de la structure de la chromatine induite par la protéine HBc, pour bloquer la réponse IFN.

Des manipulations épigénétiques ont déjà été mises en évidence dans d'autres familles virales. Elles permettraient ainsi de reprogrammer le profil d'expression des gènes cellulaires, afin d'obtenir un contexte favorable pour la réplication et la dissémination virale, pouvant aboutir *in fine* à la transformation cellulaire (Ferrari, Su et al. 2012). Ainsi, la protéine E1A de l'adénovirus oncogène pourrait également inhiber la mono-ubiquitination de l'histone H2B nécessaire à l'activation de la réponse IFN (Fonseca, Thillainadesan et al. 2012). De plus, la protéine LMP1 du virus EBV, ainsi que la protéine E7 du papillomavirus, pourraient également induire l'hyperméthylation de certains promoteurs de gènes cellulaires pour contrôler la progression du cycle cellulaire, aboutissant à l'oncogenèse des cellules infectées (Burgers, Blanchon et al. 2007; Niller, Wolf et al. 2009). Il serait dès lors intéressant de déterminer si la protéine de capsid serait également capable d'induire une hyperméthylation de l'ADN de l'hôte pour créer une empreinte immunosuppressive non réversible au niveau épigénétique.

Ainsi, parmi les divers mécanismes d'immunosuppression utilisés par HBV, on peut également citer la modification du statut épigénétique de l'ADN de l'hôte, inhibant dès lors

l'activité transcriptionnelle des gènes cellulaires. Quelques études ont également démontré que la protéine HBx pouvait interagir avec des ADN méthyl-transférases (DNMTs) et des histones dé-acétylases (HDAC1) pour modifier le statut épigénétique de la chromatine et inhiber, dans ce cas, l'expression transcriptionnelle de la cytokine IL-4 (Zheng, Zhang et al. 2009). De plus, très récemment, il a été confirmé que l'AgHBc pouvait interagir avec les promoteurs de certains gènes de l'hôte afin de réguler négativement leur transcription, ce qui pourrait représenter un nouveau mécanisme impliqué dans l'immunopathogénèse médiée par la protéine Core du virus HBV (Guo, Li et al. 2011).

Nos résultats ont finalement pu démontrer, en cellules HepaRG et en hépatocytes primaires humains infectés par HBV, que la protéine HBc contenu dans la nucléocapside « entrante » pouvait interagir de façon très précoce avec les promoteurs des gènes de l'immunité innée (IFN- $\beta$ , IL-29 et OAS1), modifier le code épigénétique des histones associées, afin de réprimer les voies IFN de type I et III (figure 31). Ainsi, ce mécanisme d'inhibition précoce couplé avec le fait que le virus HBV expose peu ces PAMPs, explique que le virus HBV ait longtemps été assimilé à un virus « invisible » pour la cellule hôte. Ce mécanisme d'inhibition opérant quelques heures post-infection était également retrouvé dans des phases chroniques d'infection (dans le modèle murin humanisé chroniquement infecté), suggérant ainsi que la protéine de capsid pouvait, d'une part être impliquée dans l'établissement de l'infection, mais également dans sa persistance. Ces résultats pourraient ainsi apporter une explication sur la dualité de localisation noyau/cytoplasme de l'AgHBc corrélée, respectivement, avec le stade de répression/activation du système immunitaire chez les patients en phase d'immunotolérance (figure 30). Outre ses fonctions impliquées dans le cycle de réplication du virus HBV, la protéine de capsid pourrait ainsi être un déterminant viral essentiel impliqué dans l'inhibition du système immunitaire par HBV.



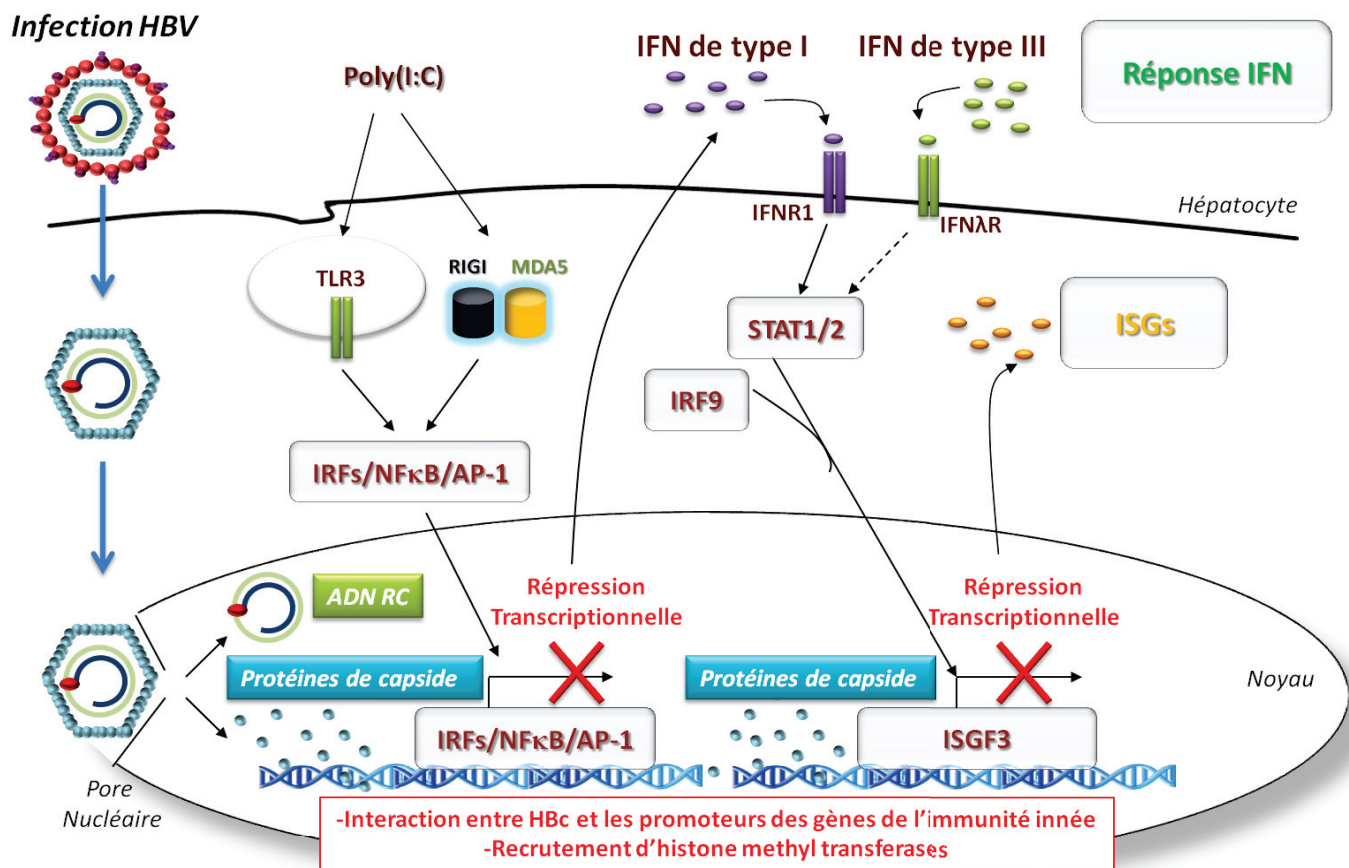


FIGURE 31 : NOUVEAU CONCEPT D'INHIBITION PRECOCE DES REPONSES IFN MEDIEE PAR LA PROTEINE HBC AU NIVEAU EPIGENETIQUE

La protéine HcBc contenue dans la nucléocapside entrante est capable d'interagir, dès 2h post-infection, avec les promoteurs des gènes de l'immunité innée, et de recruter des histone methyl-transférases pour modifier le statut épigénétique de ces gènes, et ceci afin de contrecarrer l'expression de la réponse IFN de type I et III. L'inhibition de la réponse IFN, et donc de la mise en place de l'état antiviral avec l'expression des ISGs associés, permettra au virus HBV d'établir une infection persistante dans les hépatocytes *in vitro*.

## IV-PERSPECTIVES

Le foie est un organe complexe composé de cellules parenchymateuses (hépatocytes) et de cellules non-parenchymateuses (cellules endothéliales et cellules immunitaires résidentes). Il participe à l'immunotolérance de l'organisme contre des antigènes du non-soi provenant de la digestion, mais peut également induire une réponse immunitaire, de par son immunocompétence, dans un contexte inflammatoire. Au-delà de l'hépatocyte, les étapes précoces d'interaction entre le virus HBV et les cellules du foie ne sont toujours pas bien comprises. A l'heure actuelle, plusieurs hypothèses sont formulées pour expliquer

l'adressage du virus HBV aux hépatocytes. En effet, le virus pourrait soit pénétrer directement dans les hépatocytes en passant à travers les fenestrations des cellules endothéliales, soit être endocyté par les cellules endothéliales et/ou les cellules de Kupffer pour transiter jusqu'à l'espace de Disse, avant d'infecter les hépatocytes (Breiner, Schaller et al. 2001). Les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales, qui jouent un rôle important dans la mise en place de l'immunité innée et adaptative au niveau hépatique (Knolle and Gerken 2000), pourraient ainsi être les premiers types cellulaires à rencontrer le virus HBV dans le foie. L'étude des interactions entre HBV et ces cellules est donc essentielle pour comprendre les événements précoces nécessaires à sa dissémination.

Plus particulièrement, les cellules endothéliales (LSECs) ont un rôle important dans la surveillance hépatique et dans l'élimination de nombreuses macromolécules présentes dans le sang, *via* un mécanisme d'endocytose non spécifique dépendant des récepteurs « scavengers ». Elles peuvent présenter les antigènes circulants aux lymphocytes T CD4+ et T CD8+, et ainsi orchestrer la mise en place d'une réponse immune spécifique d'un pathogène donné. Le contrôle des réponses immunitaires des cellules endothéliales par le virus HBV représenterait ainsi une stratégie essentielle pour contrecarrer la réponse immune dans le microenvironnement hépatique. Ainsi, *via* l'utilisation d'une lignée endothéliale immortalisée au laboratoire (lignée TRP-3), nous avons pu démontrer que l'antigène HBc était également capable de pénétrer dans les cellules, d'inhiber l'activation de la réponse IFN (de type I et III) médiée par la voie de signalisation TLR3, et ceci par interaction avec les promoteurs des gènes de l'hôte (IFN- $\beta$ p, IL-29p et OAS1p) (résultats non montrés). Ainsi, en plus de l'inhibition de l'état antiviral au sein des hépatocytes, le virus de l'hépatite B, et plus particulièrement l'AgHBc, pourrait induire un état global d'immunosuppression dans le microenvironnement hépatique pour pouvoir installer une infection persistante (Figure 32).

Ces résultats sont confortés par les travaux de Wu *et al.* qui avaient précédemment montré que les particules infectieuses étaient capables de contrecarrer l'activation de l'immunité innée dans des cellules endothéliales primaires murines (Wu, Meng et al. 2009). De part son mécanisme d'action indépendant de la réplication virale, et donc indépendant de la permissivité des cellules à l'infection HBV, la protéine de capsid pourrait potentiellement jouer un rôle immunosuppresseur dans divers types cellulaires. Il serait dès lors intéressant d'étudier l'impact de cette protéine de capsid sur les cellules de Kupffer, qui participent également à la dissémination du virus, mais aussi sur pDCs et les NKs/NKTs.



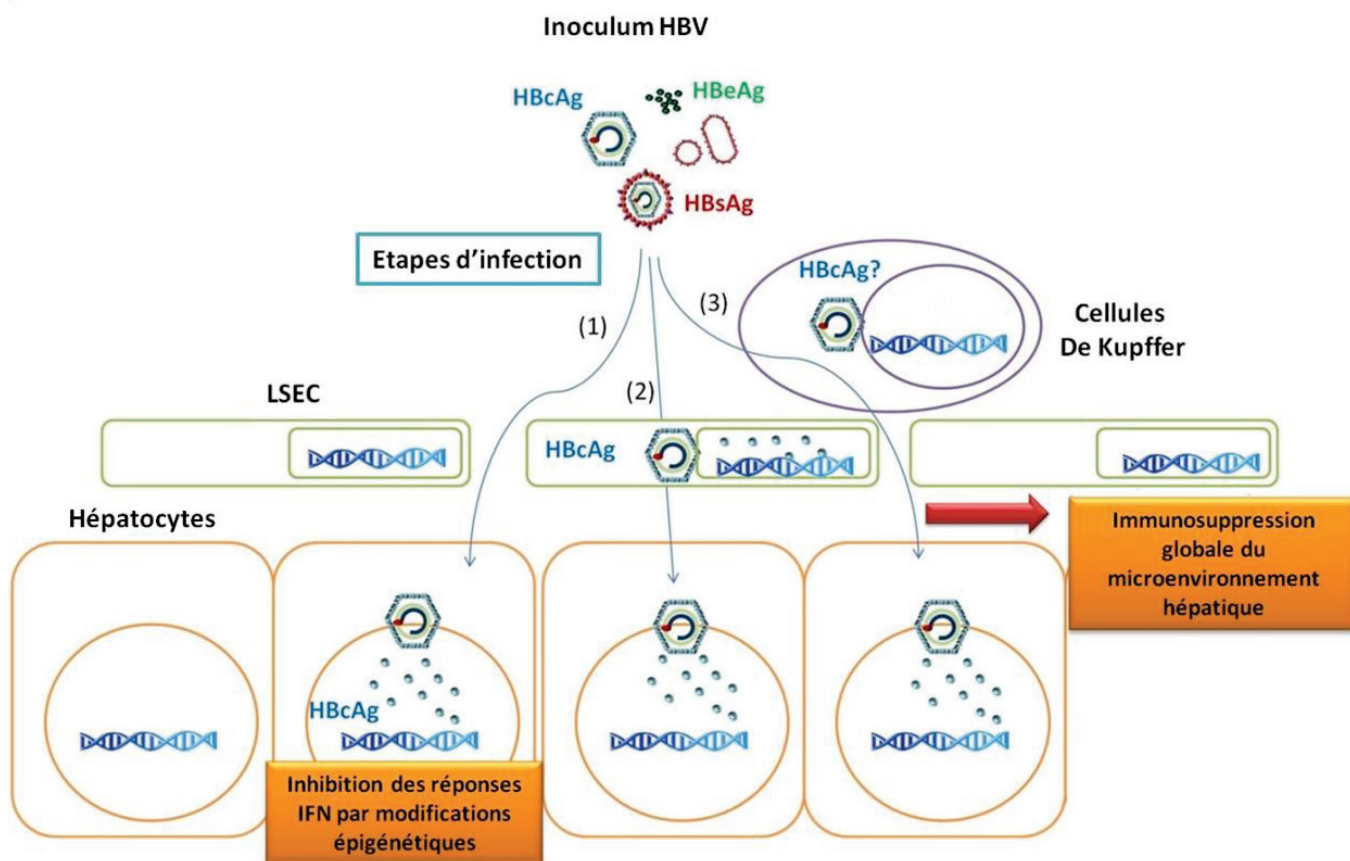


FIGURE 32 : INHIBITION PRECOCE DES REPNSES IFN INDUITE PAR LA PROTEINE DE CAPSIDE DANS LE MICROENVIRONNEMENT HEPATIQUE

Différentes hypothèses sont formulées pour expliquer l'adressage du virus aux hépatocytes. (1) le virus est directement internalisé dans les hépatocytes en passant à travers les fenestrations des cellules endothéliales. (2) le virus est endocyté par les cellules endothéliales et transite *via* l'espace de Disse jusqu'au hépatocytes. (3) le virus est endocyté par les cellules de Kupffer et transite *via* l'espace de Disse jusqu'aux hépatocytes. Dans le cas des hépatocytes et des cellules endothéliales, la nucléocapside entrante migre jusqu'au noyau, interagit avec les promoteurs des gènes de l'immunité innée, modifie leur profil épigénétique par recrutement d'histone méthyl-transférases, afin d'induire une répression précoce de la réponse IFN dans le microenvironnement hépatique.

Des données montrent par ailleurs que les cellules immunitaires (DCs, NKs/NKTs et cellules de Kupffer) pourraient également être la cible du virus (cf partie « La réponse immunitaire de l'hôte et son interaction avec le virus HBV »). Le virus HBV aurait ainsi développé divers mécanismes d'action, dans divers types cellulaires, portés par différentes protéines virales, permettant l'installation d'une infection chronique dans 5 à 10% des cas chez l'adulte immunocompétent. L'étude de ces interactions est ainsi primordiale pour mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à restaurer les fonctions immunitaires des cellules du foie afin de contrôler l'infection chez les porteurs chroniques.

Nos résultats prônent dès lors l'utilisation de composés anticapsides pouvant d'une part inhiber la réplication virale, mais également reverser la localisation nucléaire de la protéine HBc, afin de restaurer les fonctions immunitaires des hépatocytes infectés, ainsi que d'autres types cellulaires potentiellement ciblés par le virus HBV. Ces composés anticapsides pourraient également être couplés à des agonistes de PRRs stimulant la réponse innée, afin d'induire un état antiviral pouvant contrôler la réplication du virus HBV dans les cellules (Chang, Block et al. 2012).

Plus particulièrement, nos résultats démontrent que seules les voies TLR3 et RIG-I/MDA5 sont inhibées par le virus HBV complet (étude 2). Il pourrait ainsi être plus judicieux de développer des agonistes ciblant les autres senseurs pour augmenter l'efficacité de la réponse antivirale. Toutefois, la balance, entre l'inhibition de la réplication virale et les dommages hépatiques engendrés par l'inflammation, devra également être prise en compte lors de la mise en place de ces thérapies. Par exemple, la stimulation de la voie TLR2, *in vivo*, pourrait induire une réponse inflammatoire délétère comme ce qui a déjà été observé pour d'autres familles virales (Zhou, Cerny et al. 2010). De plus, contrairement à ce qui a été montré *in vitro* dans des cellules d'hépatome (Thompson, Colledge et al. 2009), elle ne permettrait pas de contrôler la réplication virale dans un modèle murin transgénique (Isogawa, Robek et al. 2005). Il est ainsi nécessaire d'avoir recours, quand cela est possible, à des modèles *in vitro* et *in vivo* infectables et immunocompétents, afin de pouvoir mettre en place ces thérapies.

Ces agonistes peuvent avoir un effet antiviral direct sur l'hépatocyte infecté, mais ils peuvent également activer les cellules immunitaires innées nécessaires à la mise en place d'une réponse adaptative, qui pourra contrôler l'infection sur le long terme. Les agonistes spécifiques de TLR4, TLR7, TLR8 et TLR9 sont ainsi prometteurs. Tout d'abord, dans l'étude 1, nous avons pu montrer que ces senseurs étaient exprimés dans les hépatocytes, et que leur stimulation par des ligands prototypiques induisait l'expression du gène IFN- $\beta$ , qui pourrait, dès lors, induire une réponse antivirale anti-HBV dans les hépatocytes infectés. Par ailleurs, les ligands TLR7 et TLR9, ou TLR4 et TLR8, pourraient également activer respectivement les pDCs et les cellules de Kupffer. Ainsi, l'effet antiviral direct sur l'hépatocyte infecté pourrait rapidement être relayé par l'activité des cellules immunitaires innées. Finalement, le réveil de la réponse adaptative, *via* l'activation des pDCs et des KCs, pourrait garantir le contrôle de la réplication sur le long terme.

Leur combinaison avec des anticapsides, pour inhiber la réplication et neutraliser l'effet immunosuppresseur de la protéine HBc, pourraient de plus exacerber la réponse antivirale. Des efforts ont déjà été réalisés dans ce sens au laboratoire, *via* l'utilisation des anticapsides Bayer41 et AT130. Contrairement aux cellules HepG2.2.15 (Brezillon, Brunelle

et al. 2011), à la lignée HepaRG-TR-HBc surexprimant la protéine HBc (étude 3), et au modèle murin transgénique exprimant stablement le génome HBV (Weber, Schlemmer et al. 2002), ces composés anticapsides, n'ont cependant montré aucune efficacité, *per se*, dans un contexte d'infection, avec la lignée HepaRG différenciée et les PHH infectés par HBV *in vitro*. En effet, des traitements journaliers (sur 4 jours), à partir de J9 post infection (quand la réplication virale est établie et persistante), et à des doses ~5 fois supérieures à l'IC50 retrouvée dans le modèle HepG2.2.15, ne permettent pas d'inhiber les synthèses d'ARN et d'ADN virales, ainsi que la sécrétion d'AgHBe (résultats non montrés). Ils sembleraient ainsi que ces composés anticapsides ne puissent pas contrôler la réplication dans un contexte naturelle d'infection. Néanmoins, il a été montré récemment que, dans le modèle murin uPA/SCID humanisé infecté par un inoculum complet HBV, la réplication virale pouvait être contrôlée par le composé Bayer41 (Brezillon, Brunelle et al. 2011). Dans cette étude, les auteurs ont cependant administré le traitement anticapside dès 10 jours post infection, lors de l'expansion logarithmique de la virémie pendant l'établissement de l'infection, et avant que celle-ci ne devienne persistante. Les composés Bayer41 et AT130 n'agissent pas sur les nucléocapsides matures, mais seulement sur les capsides/nucléocapsides en cours de formation. Leur efficacité pourrait ainsi être dépendante du stade de l'infection, et de la quantité de nucléocapsides matures (entrantes ou sortantes) déjà présente dans les cellules. En effet, ces composés anticapsides pourraient contrôler la réplication lors de l'établissement de l'infection en inhibant la formation des nucléocapsides matures. A l'inverse, une fois l'infection établie, les composés AT130 et Bayer41, aux doses administrées, ne pourraient plus contrôler le pool de nucléocapsides intracellulaires déjà formées. De plus, ces molécules pourraient être peu efficaces en hépatocytes différenciés du fait de leur instabilité, et de leur inactivation potentielle par des enzymes du métabolisme telles que CYP450 (Kermanizadeh, Gaiser et al. 2012). Ainsi, le développement d'une nouvelle génération de molécules anticapsides stables, pouvant dès lors cibler les nucléocapsides matures, permettrait de pallier à l'inefficacité de ces molécules, rencontrée lorsque l'infection est déjà établie dans les cellules infectées. Dans ce cas, un traitement avec un anticapside, associé à une stimulation de la réponse antivirale (agonistes de PRRs), pourrait représenter une stratégie prometteuse, pour imaginer un jour utiliser ces molécules chez les patients porteurs chroniques.

Par ailleurs, la mise en évidence des modifications épigénétiques induites par HBc permettrait également d'envisager de nouvelles options thérapeutiques avec l'utilisation d'inhibiteur d'histone méthyl-transférases, comme déjà décrits dans d'autres pathologies (Vedadi, Barsyte-Lovejoy et al. 2011; McCabe, Ott et al. 2012). Ainsi, un screening plus approfondi des modifications épigénétiques répressives, induite par l'AgHBc, serait nécessaire pour mettre en place une stratégie robuste afin de restaurer le potentiel immunitaire des cellules infectées par HBV.



# **BIBLIOGRAPHIE**

- Ablasser, A., F. Bauernfeind, et al. (2009). "RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate." *Nat Immunol* **10**(10): 1065-1072.
- Abou-Jaoude, G. and C. Sureau (2007). "Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange." *J Virol* **81**(23): 13057-13066.
- Abraham, T. M. and D. D. Loeb (2007). "The topology of hepatitis B virus pregenomic RNA promotes its replication." *J Virol* **81**(21): 11577-11584.
- Abramovitch, R., E. Tavor, et al. (2004). "A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression." *Cancer Res* **64**(4): 1338-1346.
- Agalioti, T., G. Chen, et al. (2002). "Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene." *Cell* **111**(3): 381-392.
- Airenne, K. J., Y. C. Hu, et al. (2013). "Baculovirus: an Insect-derived Vector for Diverse Gene Transfer Applications." *Mol Ther* **21**(4): 739-749.
- Ait-Goughoulte, M., J. Lucifora, et al. (2010). "Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus." *Viruses* **2**(7): 1394-1410.
- Alcantara, F. F., H. Tang, et al. (2002). "Functional characterization of the interferon regulatory element in the enhancer 1 region of the hepatitis B virus genome." *Nucleic Acids Res* **30**(9): 2068-2075.
- Alexopoulos, L. G., J. Saez-Rodriguez, et al. (2010). "Networks inferred from biochemical data reveal profound differences in toll-like receptor and inflammatory signaling between normal and transformed hepatocytes." *Mol Cell Proteomics* **9**(9): 1849-1865.
- Andrisani, O. M. (2013). "Deregulation of epigenetic mechanisms by the hepatitis B virus x protein in hepatocarcinogenesis." *Viruses* **5**(3): 858-872.
- Andrisani, O. M. and S. Barnabas (1999). "The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review)." *Int J Oncol* **15**(2): 373-379.
- Ank, N., M. B. Iversen, et al. (2008). "An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity." *J Immunol* **180**(4): 2474-2485.
- Antona, D., E. Couturier, et al. (2011). "[Epidemiology of viral hepatitis in France]." *Rev Prat* **61**(1): 25-27, 30-22.

- Apostolou, E. and D. Thanos (2008). "Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression." *Cell* **134**(1): 85-96.
- Arcangeletti, M. C., D. Germini, et al. (2013). "Toll-like receptor 4 is involved in the cell cycle modulation and required for effective human cytomegalovirus infection in THP-1 macrophages." *Virology* **440**(1): 19-30.
- Arzumanyan, A., H. M. Reis, et al. (2013). "Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma." *Nat Rev Cancer* **13**(2): 123-135.
- Asabe, S., S. F. Wieland, et al. (2009). "The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection." *J Virol* **83**(19): 9652-9662.
- Azuma, H., N. Paulk, et al. (2007). "Robust expansion of human hepatocytes in Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup> mice." *Nat Biotechnol* **25**(8): 903-910.
- Balato, A., D. Unutmaz, et al. (2009). "Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions." *J Invest Dermatol* **129**(7): 1628-1642.
- Bar-Yishay, I., Y. Shaul, et al. (2011). "Hepatocyte metabolic signalling pathways and regulation of hepatitis B virus expression." *Liver Int* **31**(3): 282-290.
- Bardens, A., T. Doring, et al. (2011). "Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT-independent manner." *Cell Microbiol* **13**(4): 602-619.
- Barker, L. F., F. V. Chisari, et al. (1973). "Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees." *J Infect Dis* **127**(6): 648-662.
- Barker, L. F., J. E. Maynard, et al. (1975). "Viral hepatitis, type B, in experimental animals." *Am J Med Sci* **270**(1): 189-195.
- Bartenschlager, R., M. Junker-Niepmann, et al. (1990). "The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation." *J Virol* **64**(11): 5324-5332.
- Bartholomeusz, A., B. G. Tehan, et al. (2004). "Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations." *Antivir Ther* **9**(2): 149-160.
- Basagoudanavar, S. H., D. H. Perlman, et al. (2007). "Regulation of hepadnavirus reverse transcription by dynamic nucleocapsid phosphorylation." *J Virol* **81**(4): 1641-1649.
- Bataller, R. and D. A. Brenner (2005). "Liver fibrosis." *J Clin Invest* **115**(2): 209-218.
- Baumert, T. F., C. Rosler, et al. (2007). "Hepatitis B virus DNA is subject to extensive editing by the human deaminase APOBEC3C." *Hepatology* **46**(3): 682-689.
- Beasley, R. P. (1988). "Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma." *Cancer* **61**(10): 1942-1956.



- Beck, J. and M. Nassal (2003). "Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein." *J Biol Chem* **278**(38): 36128-36138.
- Beck, J. and M. Nassal (2007). "Hepatitis B virus replication." *World J Gastroenterol* **13**(1): 48-64.
- Belloni, L., L. Allweiss, et al. (2012). "IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome." *J Clin Invest* **122**(2): 529-537.
- Belloni, L., T. Pollicino, et al. (2009). "Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(47): 19975-19979.
- Benhenda, S., D. Cougot, et al. (2009). "Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis." *Adv Cancer Res* **103**: 75-109.
- Benhenda, S., A. Ducroux, et al. (2013). "Methyltransferase PRMT1 Is a Binding Partner of HBx and a Negative Regulator of Hepatitis B Virus Transcription." *J Virol* **87**(8): 4360-4371.
- Bertoletti, A. and C. Ferrari (2012). "Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection." *Gut* **61**(12): 1754-1764.
- Bertoletti, A. and A. J. Gehring (2006). "The immune response during hepatitis B virus infection." *J Gen Virol* **87**(Pt 6): 1439-1449.
- Bertoni, R., A. Sette, et al. (1998). "Human class I supertypes and CTL repertoires extend to chimpanzees." *J Immunol* **161**(8): 4447-4455.
- Bettelli, E., T. Korn, et al. (2007). "Th17: the third member of the effector T cell trilogy." *Curr Opin Immunol* **19**(6): 652-657.
- Bieback, K., E. Lien, et al. (2002). "Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling." *J Virol* **76**(17): 8729-8736.
- Billioud, G., C. Pichoud, et al. (2012). "Decreased infectivity of nucleoside analogs-resistant hepatitis B virus mutants." *J Hepatol* **56**(6): 1269-1275.
- Billioud, G., C. Pichoud, et al. (2011). "The main hepatitis B virus (HBV) mutants resistant to nucleoside analogs are susceptible in vitro to non-nucleoside inhibitors of HBV replication." *Antiviral Res* **92**(2): 271-276.
- Bissig, K. D., T. T. Le, et al. (2007). "Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(51): 20507-20511.
- Bissig, K. D., S. F. Wieland, et al. (2010). "Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment." *J Clin Invest* **120**(3): 924-930.

- Blasius, A. L. and B. Beutler (2010). "Intracellular toll-like receptors." *Immunity* **32**(3): 305-315.
- Block, T. M., H. Guo, et al. (2007). "Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians." *Clin Liver Dis* **11**(4): 685-706, vii.
- Blumberg, B. S. (2002). "The discovery of the hepatitis B virus and the invention of the vaccine: a scientific memoir." *J Gastroenterol Hepatol* **17 Suppl**: S502-503.
- Blumberg, B. S., H. J. Alter, et al. (1965). "A "New" Antigen in Leukemia Sera." *JAMA* **191**: 541-546.
- Blumberg, B. S. and N. M. Riddell (1963). "Inherited antigenic differences in human serum beta lipoproteins. A second antiserum." *J Clin Invest* **42**: 867-875.
- Bocher, W. O., S. Herzog-Hauff, et al. (1999). "Kinetics of hepatitis B surface antigen-specific immune responses in acute and chronic hepatitis B or after HBs vaccination: stimulation of the in vitro antibody response by interferon gamma." *Hepatology* **29**(1): 238-244.
- Bock, C. T., N. P. Malek, et al. (2000). "The enhancer I core region contributes to the replication level of hepatitis B virus in vivo and in vitro." *J Virol* **74**(5): 2193-2202.
- Bock, C. T., S. Schwinn, et al. (2001). "Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome." *J Mol Biol* **307**(1): 183-196.
- Boehme, K. W., M. Guerrero, et al. (2006). "Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells." *J Immunol* **177**(10): 7094-7102.
- Bolinger, C., A. Sharma, et al. (2010). "RNA helicase A modulates translation of HIV-1 and infectivity of progeny virions." *Nucleic Acids Res* **38**(5): 1686-1696.
- Bontron, S., N. Lin-Marq, et al. (2002). "Hepatitis B virus X protein associated with UV-DDB1 induces cell death in the nucleus and is functionally antagonized by UV-DDB2." *J Biol Chem* **277**(41): 38847-38854.
- Bonvin, M. and J. Greeve (2008). "Hepatitis B: modern concepts in pathogenesis--APOBEC3 cytidine deaminases as effectors in innate immunity against the hepatitis B virus." *Curr Opin Infect Dis* **21**(3): 298-303.
- Bortolotti, F., M. Guido, et al. (2006). "Chronic hepatitis B in children after e antigen seroclearance: final report of a 29-year longitudinal study." *Hepatology* **43**(3): 556-562.
- Bottcher, B., N. Tsuji, et al. (1998). "Peptides that block hepatitis B virus assembly: analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection." *Embo J* **17**(23): 6839-6845.
- Bouchard, M. J., L. Wang, et al. (2006). "Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication." *J Virol* **80**(9): 4406-4414.



- Bourne, C., S. Lee, et al. (2008). "Small-molecule effectors of hepatitis B virus capsid assembly give insight into virus life cycle." *J Virol* **82**(20): 10262-10270.
- Bradley, D. W., K. Krawczynski, et al. (1987). "Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm viruslike particles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(17): 6277-6281.
- Brechot, C. (2004). "Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms." *Gastroenterology* **127**(5 Suppl 1): S56-61.
- Breiner, K. M., H. Schaller, et al. (2001). "Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms." *Hepatology* **34**(4 Pt 1): 803-808.
- Brezillon, N., M. N. Brunelle, et al. (2011). "Antiviral activity of Bay 41-4109 on hepatitis B virus in humanized Alb-uPA/SCID mice." *PLoS One* **6**(12): e25096.
- Brooks, D. G., S. J. Ha, et al. (2008). "IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(51): 20428-20433.
- Bruss, V. (2004). "Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid." *Virus Res* **106**(2): 199-209.
- Bruss, V. (2007). "Hepatitis B virus morphogenesis." *World J Gastroenterol* **13**(1): 65-73.
- Bruss, V. and D. Ganem (1991). "The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(3): 1059-1063.
- Bruss, V. and K. Vieluf (1995). "Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis." *J Virol* **69**(11): 6652-6657.
- Bulla, G. A. and A. Siddiqui (1989). "Negative regulation of the hepatitis B virus pre-S1 promoter by internal DNA sequences." *Virology* **170**(1): 251-260.
- Burgers, W. A., L. Blanchon, et al. (2007). "Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases." *Oncogene* **26**(11): 1650-1655.
- Buster, E. H., H. J. Flink, et al. (2008). "Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b." *Gastroenterology* **135**(2): 459-467.
- Cao, F., M. P. Badtke, et al. (2005). "Identification of an essential molecular contact point on the duck hepatitis B virus reverse transcriptase." *J Virol* **79**(16): 10164-10170.
- Cha, M. Y., D. K. Ryu, et al. (2009). "Stimulation of hepatitis B virus genome replication by HBx is linked to both nuclear and cytoplasmic HBx expression." *J Gen Virol* **90**(Pt 4): 978-986.

- Chain, B. M. and R. Myers (2005). "Variability and conservation in hepatitis B virus core protein." *BMC Microbiol* **5**: 33.
- Chan, H. L., V. W. Wong, et al. (2007). "Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response." *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**(12): 1462-1468.
- Chang, C., G. Enders, et al. (1987). "Expression of the precore region of an avian hepatitis B virus is not required for viral replication." *J Virol* **61**(10): 3322-3325.
- Chang, J., T. M. Block, et al. (2012). "The innate immune response to hepatitis B virus infection: implications for pathogenesis and therapy." *Antiviral Res* **96**(3): 405-413.
- Chang, S. F., H. J. Netter, et al. (1999). "A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA." *Virology* **262**(1): 39-54.
- Chemin, I. and F. Zoulim (2009). "Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma." *Cancer Lett* **286**(1): 52-59.
- Chen, H. L., M. H. Chang, et al. (1996). "Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children: Ten years of mass vaccination in Taiwan." *Jama* **276**(11): 906-908.
- Chen, I. H., C. J. Huang, et al. (1995). "Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promoter of hepatitis B virus." *J Virol* **69**(6): 3647-3657.
- Chen, M., S. Hieng, et al. (1994). "Regulation of hepatitis B virus EN1 enhancer activity by hepatocyte-enriched transcription factor HNF3." *Virology* **205**(1): 127-132.
- Chen, M. and J. H. Ou (1995). "Cell type-dependent regulation of the activity of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter." *Virology* **214**(1): 198-206.
- Chen, M. T., J. N. Billaud, et al. (2004). "A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(41): 14913-14918.
- Chen, Y., H. Wei, et al. (2007). "Increased susceptibility to liver injury in hepatitis B virus transgenic mice involves NKG2D-ligand interaction and natural killer cells." *Hepatology* **46**(3): 706-715.
- Chen, Y., H. Wei, et al. (2005). "Impaired function of hepatic natural killer cells from murine chronic HBsAg carriers." *Int Immunopharmacol* **5**(13-14): 1839-1852.
- Chen, Z., Y. Cheng, et al. (2008). "Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients." *Clin Immunol* **128**(3): 400-408.
- Cherrington, J., R. Russnak, et al. (1992). "Upstream sequences and cap proximity in the regulation of polyadenylation in ground squirrel hepatitis virus." *J Virol* **66**(12): 7589-7596.

- Chisari, F. V. (1989). "Hepatitis B virus gene expression in transgenic mice." *Mol Biol Med* **6**(2): 143-149.
- Chisari, F. V., M. Isogawa, et al. (2010). "Pathogenesis of hepatitis B virus infection." *Pathol Biol (Paris)* **58**(4): 258-266.
- Chisari, F. V., C. A. Pinkert, et al. (1985). "A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state." *Science* **230**(4730): 1157-1160.
- Chiu, Y. H., J. B. Macmillan, et al. (2009). "RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway." *Cell* **138**(3): 576-591.
- Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." *Science* **244**(4902): 359-362.
- Christen, V., F. Duong, et al. (2007). "Inhibition of alpha interferon signaling by hepatitis B virus." *J Virol* **81**(1): 159-165.
- Chu, C. M., C. T. Yeh, et al. (1995). "Subcellular localization of hepatitis B core antigen in relation to hepatocyte regeneration in chronic hepatitis B." *Gastroenterology* **109**(6): 1926-1932.
- Civitico, G. M. and S. A. Locarnini (1994). "The half-life of duck hepatitis B virus supercoiled DNA in congenitally infected primary hepatocyte cultures." *Virology* **203**(1): 81-89.
- Contoli, M., S. D. Message, et al. (2006). "Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations." *Nat Med* **12**(9): 1023-1026.
- Cooper, A. and Y. Shaul (2006). "Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles." *J Biol Chem* **281**(24): 16563-16569.
- Cougot, D., E. Allemand, et al. (2012). "Inhibition of PP1 phosphatase activity by HBx: a mechanism for the activation of hepatitis B virus transcription." *Sci Signal* **5**(205): ra1.
- Cougot, D., Y. Wu, et al. (2007). "The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription." *J Biol Chem* **282**(7): 4277-4287.
- Courouce, A. M. (1976). "Subtypes of HBsAg in Europe and Africa." *Bibl Haematol* **42**: 52-57.
- Cova, L. and F. Zoulim (2004). "Duck hepatitis B virus model in the study of hepatitis B virus." *Methods Mol Med* **96**: 261-268.
- Crispe, I. N. (2009). "The liver as a lymphoid organ." *Annu Rev Immunol* **27**: 147-163.
- Crowther, R. A., N. A. Kiselev, et al. (1994). "Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy." *Cell* **77**(6): 943-950.

- Cui, F., Y. Wang, et al. (2006). "The up-regulation of proteasome subunits and lysosomal proteases in hepatocellular carcinomas of the HBx gene knockin transgenic mice." *Proteomics* **6**(2): 498-504.
- Dandri, M., M. R. Burda, et al. (2005). "Chronic infection with hepatitis B viruses and antiviral drug evaluation in uPA mice after liver repopulation with tupaia hepatocytes." *J Hepatol* **42**(1): 54-60.
- Dandri, M. and S. Locarnini (2012). "New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection." *Gut* **61 Suppl 1**: i6-17.
- Dandri, M., M. Lutgehetmann, et al. (2013). "Experimental models and therapeutic approaches for HBV." *Semin Immunopathol* **35**(1): 7-21.
- Dandri, M., M. Lutgehetmann, et al. (2006). "Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis." *Semin Liver Dis* **26**(2): 181-191.
- Dandri, M. and J. Petersen (2012). "Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection." *J Hepatol* **56**(2): 493-495.
- Dane, D. S., C. H. Cameron, et al. (1970). "Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis." *Lancet* **1**(7649): 695-698.
- Daub, H., S. Blencke, et al. (2002). "Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein." *J Virol* **76**(16): 8124-8137.
- De Clercq, E. (1999). "Perspectives for the treatment of hepatitis B virus infections." *Int J Antimicrob Agents* **12**(2): 81-95.
- Dejean, A., L. Bougueleret, et al. (1986). "Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma." *Nature* **322**(6074): 70-72.
- Deka, N., M. D. Sharma, et al. (1994). "Isolation of the novel agent from human stool samples that is associated with sporadic non-A, non-B hepatitis." *J Virol* **68**(12): 7810-7815.
- Della Chiesa, M., C. Romagnani, et al. (2006). "Multidirectional interactions are bridging human NK cells with plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells during innate immune responses." *Blood* **108**(12): 3851-3858.
- Deny, P. and F. Zoulim (2010). "Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment." *Pathol Biol (Paris)* **58**(4): 245-253.
- Deonarain, R., A. Alcami, et al. (2000). "Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon." *J Virol* **74**(7): 3404-3409.
- Deres, K., C. H. Schroder, et al. (2003). "Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids." *Science* **299**(5608): 893-896.

- Dhason, M. S., J. C. Wang, et al. (2012). "Differential assembly of Hepatitis B Virus core protein on single- and double-stranded nucleic acid suggest the dsDNA-filled core is spring-loaded." *Virology* **430**(1): 20-29.
- Diao, J., R. Garces, et al. (2001). "X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis." *Cytokine Growth Factor Rev* **12**(2-3): 189-205.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, et al. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." *Science* **303**(5663): 1529-1531.
- Dienes, H. P., G. Gerken, et al. (1995). "Analysis of the precore DNA sequence and detection of precore antigen in liver specimens from patients with anti-hepatitis B e-positive chronic hepatitis." *Hepatology* **21**(1): 1-7.
- Dixit, E., S. Boulant, et al. (2010). "Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity." *Cell* **141**(4): 668-681.
- Doitsh, G. and Y. Shaul (2004). "Enhancer I predominance in hepatitis B virus gene expression." *Mol Cell Biol* **24**(4): 1799-1808.
- Dong, Z., H. Wei, et al. (2007). "The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration." *Cell Mol Immunol* **4**(4): 241-252.
- Doyle, S. E., H. Schreckhise, et al. (2006). "Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes." *Hepatology* **44**(4): 896-906.
- Dragan, A. I., V. V. Hargreaves, et al. (2007). "Mechanisms of activation of interferon regulator factor 3: the role of C-terminal domain phosphorylation in IRF-3 dimerization and DNA binding." *Nucleic Acids Res* **35**(11): 3525-3534.
- Dryden, K. A., S. F. Wieland, et al. (2006). "Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy." *Mol Cell* **22**(6): 843-850.
- Dunn, C., D. Peppas, et al. (2009). "Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection." *Gastroenterology* **137**(4): 1289-1300.
- Dupinay, T., T. Gheit, et al. (2013). "Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among *Macaca fascicularis* from Mauritius Island." *Hepatology*.
- Durantel, D. (2010). "Fitness and infectivity of drug-resistant and cross-resistant hepatitis B virus mutants: why and how is it studied?" *Antivir Ther* **15**(3 Pt B): 521-527.
- Durantel, D., M. N. Brunelle, et al. (2005). "Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing." *J Clin Virol* **34** **Suppl 1**: S34-43.



- Durantel, D., S. Carrouee-Durantel, et al. (2004). "A new strategy for studying in vitro the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus." *Hepatology* **40**(4): 855-864.
- Durantel, D. and F. Zoulim (2009). "Innate response to hepatitis B virus infection: observations challenging the concept of a stealth virus." *Hepatology* **50**(6): 1692-1695.
- Ebert, G., H. Poeck, et al. (2011). "5' Triphosphorylated small interfering RNAs control replication of hepatitis B virus and induce an interferon response in human liver cells and mice." *Gastroenterology* **141**(2): 696-706, 706 e691-693.
- Eble, B. E., V. R. Lingappa, et al. (1990). "The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences." *J Virol* **64**(3): 1414-1419.
- Eble, B. E., D. R. MacRae, et al. (1987). "Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen." *Mol Cell Biol* **7**(10): 3591-3601.
- Eckhardt, S. G., D. R. Milich, et al. (1991). "Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus." *J Virol* **65**(2): 575-582.
- El-Serag, H. B. (2012). "Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma." *Gastroenterology* **142**(6): 1264-1273 e1261.
- Enomoto, M., Y. Sawano, et al. (2006). "High phosphorylation of HBV core protein by two alpha-type CK2-activated cAMP-dependent protein kinases in vitro." *FEBS Lett* **580**(3): 894-899.
- Ewald, S. E. and G. M. Barton (2011). "Nucleic acid sensing Toll-like receptors in autoimmunity." *Curr Opin Immunol* **23**(1): 3-9.
- Fallot, G., C. Neuveut, et al. (2012). "Diverse roles of hepatitis B virus in liver cancer." *Curr Opin Virol* **2**(4): 467-473.
- Farci, P. and G. A. Niro (2012). "Clinical features of hepatitis D." *Semin Liver Dis* **32**(3): 228-236.
- Fares, N. and J. M. Peron (2013). "[Epidemiology, natural history, and risk factors of hepatocellular carcinoma]." *Rev Prat* **63**(2): 216-217, 220-212.
- Fattovich, G., F. Bortolotti, et al. (2008). "Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors." *J Hepatol* **48**(2): 335-352.
- Feitelson, M. A., L. J. DeTolla, et al. (1988). "A chronic carrierlike state is established in nude mice injected with cloned hepatitis B virus DNA." *J Virol* **62**(4): 1408-1415.

- Fernandez, M., J. A. Quiroga, et al. (2003). "Hepatitis B virus downregulates the human interferon-inducible MxA promoter through direct interaction of precore/core proteins." *J Gen Virol* **84**(Pt 8): 2073-2082.
- Fernholz, D., M. Stemler, et al. (1991). "Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein." *J Hepatol* **13 Suppl 4**: S102-104.
- Ferrari, R., T. Su, et al. (2012). "Reorganization of the host epigenome by a viral oncogene." *Genome Res* **22**(7): 1212-1221.
- Fiola, S., D. Gosselin, et al. (2010). "TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells." *J Immunol* **185**(6): 3620-3631.
- Fisicaro, P., C. Valdatta, et al. (2010). "Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B." *Gastroenterology* **138**(2): 682-693, 693 e681-684.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., J. Dai, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history." *Cytokine Growth Factor Rev* **19**(1): 3-19.
- Fletcher, S. P., D. J. Chin, et al. (2013). "Identification of an intrahepatic transcriptional signature associated with self-limiting infection in the woodchuck model of hepatitis B." *Hepatology* **57**(1): 13-22.
- Fletcher, S. P., D. J. Chin, et al. (2012). "Transcriptomic analysis of the woodchuck model of chronic hepatitis B." *Hepatology* **56**(3): 820-830.
- Fonseca, G. J., G. Thillainadesan, et al. (2012). "Adenovirus evasion of interferon-mediated innate immunity by direct antagonism of a cellular histone posttranslational modification." *Cell Host Microbe* **11**(6): 597-606.
- Ford, E. and D. Thanos (2010). "The transcriptional code of human IFN-beta gene expression." *Biochim Biophys Acta* **1799**(3-4): 328-336.
- Foster, W. K., D. S. Miller, et al. (2005). "Effect of antiviral treatment with entecavir on age- and dose-related outcomes of duck hepatitis B virus infection." *J Virol* **79**(9): 5819-5832.
- Fukai, K., S. Takada, et al. (1997). "Characterization of a specific region in the hepatitis B virus enhancer I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell." *Virology* **236**(2): 279-287.
- Funk, A., M. Mhamdi, et al. (2007). "Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism." *World J Gastroenterol* **13**(1): 91-103.
- Gallina, A., F. Bonelli, et al. (1989). "A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids." *J Virol* **63**(11): 4645-4652.
- Ganem, D. and A. M. Prince (2004). "Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences." *N Engl J Med* **350**(11): 1118-1129.

- Gao, W. and J. Hu (2007). "Formation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: removal of genome-linked protein." *J Virol* **81**(12): 6164-6174.
- Ge, J., K. Wang, et al. (2010). "Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B." *J Clin Immunol* **30**(1): 60-67.
- Gehring, A. J., D. Sun, et al. (2007). "The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function." *J Virol* **81**(6): 2940-2949.
- Genin, P., R. Lin, et al. (2012). "Recruitment of histone deacetylase 3 to the interferon-A gene promoters attenuates interferon expression." *PLoS One* **7**(6): e38336.
- Gerelsaikhan, T., J. E. Tavis, et al. (1996). "Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis." *J Virol* **70**(7): 4269-4274.
- Gheit, T., S. Sekkat, et al. (2002). "Experimental transfection of *Macaca sylvanus* with cloned human hepatitis B virus." *J Gen Virol* **83**(Pt 7): 1645-1649.
- Gilbert, R. J., L. Beales, et al. (2005). "Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(41): 14783-14788.
- Giles, M. L., K. Visvanathan, et al. (2012). "Chronic hepatitis B infection and pregnancy." *Obstet Gynecol Surv* **67**(1): 37-44.
- Gilliet, M., W. Cao, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases." *Nat Rev Immunol* **8**(8): 594-606.
- Glebe, D. and S. Urban (2007). "Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry." *World J Gastroenterol* **13**(1): 22-38.
- Glebe, D., S. Urban, et al. (2005). "Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes." *Gastroenterology* **129**(1): 234-245.
- Goila-Gaur, R. and K. Strebel (2008). "HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity." *Retrovirology* **5**: 51.
- Gorden, K. B., K. S. Gorski, et al. (2005). "Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8." *J Immunol* **174**(3): 1259-1268.
- Gowen, B. B., J. D. Hoopes, et al. (2006). "TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to Phlebovirus infection." *J Immunol* **177**(9): 6301-6307.
- Greenberg, H. B., R. B. Pollard, et al. (1976). "Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis." *N Engl J Med* **295**(10): 517-522.
- Gregoire, C., L. Chasson, et al. (2007). "The trafficking of natural killer cells." *Immunol Rev* **220**: 169-182.
- Gregory, S. M., B. K. Davis, et al. (2011). "Discovery of a viral NLR homolog that inhibits the inflammasome." *Science* **331**(6015): 330-334.



- Grethe, S., J. O. Heckel, et al. (2000). "Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates." *J Virol* **74**(11): 5377-5381.
- Gripon, P., I. Cannie, et al. (2005). "Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein." *J Virol* **79**(3): 1613-1622.
- Gripon, P., C. Diot, et al. (1988). "Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide." *J Virol* **62**(11): 4136-4143.
- Gripon, P., J. Le Seyec, et al. (1995). "Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity." *Virology* **213**(2): 292-299.
- Gripon, P., S. Rumin, et al. (2002). "Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15655-15660.
- Grompe, M., M. al-Dhalimy, et al. (1993). "Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice." *Genes Dev* **7**(12A): 2298-2307.
- Grompe, M., S. Lindstedt, et al. (1995). "Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I." *Nat Genet* **10**(4): 453-460.
- Guidotti, L. G. and F. V. Chisari (2006). "Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis." *Annu Rev Pathol* **1**: 23-61.
- Guidotti, L. G., T. Ishikawa, et al. (1996). "Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes." *Immunity* **4**(1): 25-36.
- Guidotti, L. G., A. Morris, et al. (2002). "Interferon-regulated pathways that control hepatitis B virus replication in transgenic mice." *J Virol* **76**(6): 2617-2621.
- Guidotti, L. G., R. Rochford, et al. (1999). "Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection." *Science* **284**(5415): 825-829.
- Guo, H., D. Jiang, et al. (2009). "Activation of pattern recognition receptor-mediated innate immunity inhibits the replication of hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells." *J Virol* **83**(2): 847-858.
- Guo, H., D. Jiang, et al. (2007). "Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation." *J Virol* **81**(22): 12472-12484.
- Guo, J. T. and J. C. Pugh (1997). "Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis." *J Virol* **71**(2): 1107-1114.
- Guo, W. T., K. D. Bell, et al. (1991). "Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter complex." *J Virol* **65**(12): 6686-6692.

- Guo, Y., W. Kang, et al. (2012). "Hepatitis B viral core protein disrupts human host gene expression by binding to promoter regions." *BMC Genomics* **13**: 563.
- Guo, Y. H., Y. N. Li, et al. (2011). "HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state." *Epigenetics* **6**(6): 720-726.
- Gupta, K. and C. Cooper (2008). "A review of the role of CpG oligodeoxynucleotides as toll-like receptor 9 agonists in prophylactic and therapeutic vaccine development in infectious diseases." *Drugs R D* **9**(3): 137-145.
- Guy, C. S., P. M. Mulrooney-Cousins, et al. (2008). "Intrahepatic expression of genes affiliated with innate and adaptive immune responses immediately after invasion and during acute infection with woodchuck hepadnavirus." *J Virol* **82**(17): 8579-8591.
- Habig, J. W. and D. D. Loeb (2006). "Sequence identity of the direct repeats, DR1 and DR2, contributes to the discrimination between primer translocation and in situ priming during replication of the duck hepatitis B virus." *J Mol Biol* **364**(1): 32-43.
- Haller, O. and G. Kochs (2002). "Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity." *Traffic* **3**(10): 710-717.
- Hantz, O., H. S. Allaudeen, et al. (1984). "Inhibition of human and woodchuck hepatitis virus DNA polymerase by the triphosphates of acyclovir, 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)-5-iodocytosine and E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine." *Antiviral Res* **4**(4): 187-199.
- Hantz, O., R. Parent, et al. (2009). "Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells." *J Gen Virol* **90**(Pt 1): 127-135.
- Hardarson, H. S., J. S. Baker, et al. (2007). "Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(1): H251-258.
- Harrison, T. J. (2006). "Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants." *Semin Liver Dis* **26**(2): 87-96.
- Hasan, U., C. Chaffois, et al. (2005). "Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88." *J Immunol* **174**(5): 2942-2950.
- Hatziaepostolou, M., C. Polytarchou, et al. (2011). "An HNF4alpha-miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis." *Cell* **147**(6): 1233-1247.
- Heermann, K. H., U. Goldmann, et al. (1984). "Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence." *J Virol* **52**(2): 396-402.
- Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* **303**(5663): 1526-1529.

- Hodgson, A. J., J. M. Hyser, et al. (2012). "Hepatitis B virus regulatory HBx protein binding to DDB1 is required but is not sufficient for maximal HBV replication." *Virology* **426**(1): 73-82.
- Hollinger, F. B., B. Bell, et al. (2007). "Hepatitis A and B vaccination and public health." *J Viral Hepat* **14 Suppl 1**: 1-5.
- Honda, K., H. Yanai, et al. (2005). "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses." *Nature* **434**(7034): 772-777.
- Horan, K. A., K. Hansen, et al. (2013). "Proteasomal degradation of herpes simplex virus capsids in macrophages releases DNA to the cytosol for recognition by DNA sensors." *J Immunol* **190**(5): 2311-2319.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, et al. (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." *J Immunol* **168**(9): 4531-4537.
- Hosel, M., M. Quasdorff, et al. (2009). "Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection." *Hepatology* **50**(6): 1773-1782.
- Hou, J., Z. Liu, et al. (2005). "Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection." *Int J Med Sci* **2**(1): 50-57.
- Hsieh, Y. H., I. J. Su, et al. (2004). "Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage." *Carcinogenesis* **25**(10): 2023-2032.
- Hu, J., D. Flores, et al. (2004). "Requirement of heat shock protein 90 for human hepatitis B virus reverse transcriptase function." *J Virol* **78**(23): 13122-13131.
- Hu, Z., Z. Zhang, et al. (1999). "Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex." *J Virol* **73**(9): 7231-7240.
- Huang, C. J., Y. H. Chen, et al. (2000). "Hepatitis B virus core protein interacts with the C-terminal region of actin-binding protein." *J Biomed Sci* **7**(2): 160-168.
- Huang, H. C., C. C. Chen, et al. (2012). "Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis." *J Virol* **86**(17): 9443-9453.
- Huang, L. R., Y. A. Gabel, et al. (2012). "Transfer of HBV genomes using low doses of adenovirus vectors leads to persistent infection in immune competent mice." *Gastroenterology* **142**(7): 1447-1450 e1443.
- Huang, Z., J. C. van Velkinburgh, et al. (2012). "Pivotal roles of the interleukin-23/T helper 17 cell axis in hepatitis B." *Liver Int* **32**(6): 894-901.
- Hughes, S. A., H. Wedemeyer, et al. (2011). "Hepatitis delta virus." *Lancet* **378**(9785): 73-85.

- Hui, C. K., N. Leung, et al. (2007). "Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase." *Hepatology* **46**(2): 395-401.
- Ilan, E., T. Burakova, et al. (1999). "The hepatitis B virus-trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents." *Hepatology* **29**(2): 553-562.
- Im, S. J., S. H. Yang, et al. (2009). "Increase of Plasma IL-12/p40 Ratio Induced by the Combined Therapy of DNA Vaccine and Lamivudine Correlates with Sustained Viremia Control in CHB Carriers." *Immune Netw* **9**(1): 20-26.
- Ishida, H., K. Ueda, et al. (2000). "Identification of multiple transcription factors, HLF, FTF, and E4BP4, controlling hepatitis B virus enhancer II." *J Virol* **74**(3): 1241-1251.
- Ishii, K. J. and S. Akira (2006). "Innate immune recognition of, and regulation by, DNA." *Trends Immunol* **27**(11): 525-532.
- Ishikawa, H., Z. Ma, et al. (2009). "STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity." *Nature* **461**(7265): 788-792.
- Isogawa, M., K. Kakimi, et al. (2005). "Differential dynamics of the peripheral and intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis B surface antigen." *Virology* **333**(2): 293-300.
- Isogawa, M., M. D. Robek, et al. (2005). "Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo." *J Virol* **79**(11): 7269-7272.
- Jackson, W. T., T. H. Giddings, Jr., et al. (2005). "Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses." *PLoS Biol* **3**(5): e156.
- Janssen, H. L., M. van Zonneveld, et al. (2005). "Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial." *Lancet* **365**(9454): 123-129.
- Jiang, J. and H. Tang (2010). "Mechanism of inhibiting type I interferon induction by hepatitis B virus X protein." *Protein Cell* **1**(12): 1106-1117.
- Ju, Y., N. Hou, et al. (2010). "T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B." *J Hepatol* **52**(3): 322-329.
- Julander, J. G., R. J. Colonno, et al. (2003). "Characterization of antiviral activity of entecavir in transgenic mice expressing hepatitis B virus." *Antiviral Res* **59**(3): 155-161.
- Jung, M. C. and G. R. Pape (2002). "Immunology of hepatitis B infection." *Lancet Infect Dis* **2**(1): 43-50.
- Kaczorowski, M. and M. Jutel (2013). "Human T Regulatory Cells: On the Way to Cognition." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*.

- Kadowaki, N. (2009). "The divergence and interplay between pDC and mDC in humans." *Front Biosci* **14**: 808-817.
- Kamili, S., V. Sozzi, et al. (2009). "Efficacy of hepatitis B vaccine against antiviral drug-resistant hepatitis B virus mutants in the chimpanzee model." *Hepatology* **49**(5): 1483-1491.
- Kane, A., J. Lloyd, et al. (1999). "Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates." *Bull World Health Organ* **77**(10): 801-807.
- Kann, M., A. Schmitz, et al. (2007). "Intracellular transport of hepatitis B virus." *World J Gastroenterol* **13**(1): 39-47.
- Kann, M., B. Sodeik, et al. (1999). "Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex." *J Cell Biol* **145**(1): 45-55.
- Kann, M., R. Thomssen, et al. (1993). "Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus." *Arch Virol Suppl* **8**: 53-62.
- Kao, J. H. (2011). "Molecular epidemiology of hepatitis B virus." *Korean J Intern Med* **26**(3): 255-261.
- Katen, S. P., S. R. Chirapu, et al. (2010). "Trapping of hepatitis B virus capsid assembly intermediates by phenylpropenamide assembly accelerators." *ACS Chem Biol* **5**(12): 1125-1136.
- Kato, H., S. Sato, et al. (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." *Immunity* **23**(1): 19-28.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2008). "Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5." *J Exp Med* **205**(7): 1601-1610.
- Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* **11**(5): 373-384.
- Kay, A. and F. Zoulim (2007). "Hepatitis B virus genetic variability and evolution." *Virus Res* **127**(2): 164-176.
- Kermanizadeh, A., B. K. Gaiser, et al. (2012). "Primary human hepatocytes versus hepatic cell line: assessing their suitability for in vitro nanotoxicology." *Nanotoxicology*.
- Kew, M. C. (2011). "Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma." *J Gastroenterol Hepatol* **26 Suppl 1**: 144-152.
- Khare, S., S. S. Negi, et al. (2012). "Genetic analysis of precore/core and partial pol genes in an unprecedented outbreak of fulminant hepatitis B in India." *Epidemiol Infect* **140**(10): 1823-1829.



- Kidd-Ljunggren, K., A. Holmberg, et al. (2006). "High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers." *J Hosp Infect* **64**(4): 352-357.
- Kim, B. K., P. A. Revill, et al. (2011). "HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B." *Antivir Ther* **16**(8): 1169-1186.
- Kimura, T., N. Ohno, et al. (2005). "Hepatitis B virus DNA-negative Dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain." *J Biol Chem* **280**(23): 21713-21719.
- Klein, C., C. T. Bock, et al. (2003). "Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA." *Gastroenterology* **125**(1): 9-18.
- Knolle, P. A. and G. Gerken (2000). "Local control of the immune response in the liver." *Immunol Rev* **174**: 21-34.
- Knolle, P. A. and A. Limmer (2003). "Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells." *Swiss Med Wkly* **133**(37-38): 501-506.
- Kock, J., M. Nassal, et al. (2004). "Hepatitis B virus nucleocapsids formed by carboxy-terminally mutated core proteins contain spliced viral genomes but lack full-size DNA." *J Virol* **78**(24): 13812-13818.
- Kosovsky, M. J. and A. Siddiqui (1999). "Biochemical and functional properties of a palindromic sequence motif within the hepatitis B virus enhancer 1." *Virology* **259**(1): 60-66.
- Kotenko, S. V. (2011). "IFN-lambdas." *Curr Opin Immunol* **23**(5): 583-590.
- Kramvis, A., M. Kew, et al. (2005). "Hepatitis B virus genotypes." *Vaccine* **23**(19): 2409-2423.
- Krebs, P., M. J. Barnes, et al. (2009). "NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses." *Blood* **113**(26): 6593-6602.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." *Int Rev Immunol* **30**(1): 16-34.
- Kumar, M., S. Y. Jung, et al. (2011). "Hepatitis B virus regulatory HBx protein binds to adaptor protein IPS-1 and inhibits the activation of beta interferon." *J Virol* **85**(2): 987-995.
- Kurt-Jones, E. A., M. Chan, et al. (2004). "Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1315-1320.
- Ladner, S. K., M. J. Otto, et al. (1997). "Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(8): 1715-1720.

- Lai, C. L. and M. F. Yuen (2007). "The natural history of chronic hepatitis B." *J Viral Hepat* **14 Suppl 1**: 6-10.
- Lambert, C., T. Doring, et al. (2007). "Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin." *J Virol* **81**(17): 9050-9060.
- Lambert, C. and R. Prange (2003). "Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5199-5204.
- Lamkanfi, M. and V. M. Dixit (2011). "Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens." *J Immunol* **187**(2): 597-602.
- Lanford, R. E., D. Chavez, et al. (1998). "Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5757-5761.
- Lanford, R. E., B. Guerra, et al. (2013). "GS-9620, an Oral Agonist of Toll-Like Receptor-7, Induces Prolonged Suppression of Hepatitis B Virus in Chronically Infected Chimpanzees." *Gastroenterology*.
- Lanford, R. E., L. Notvall, et al. (1995). "Nucleotide priming and reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase expressed in insect cells." *J Virol* **69**(7): 4431-4439.
- Lanford, R. E., L. Notvall, et al. (1997). "Transcomplementation of nucleotide priming and reverse transcription between independently expressed TP and RT domains of the hepatitis B virus reverse transcriptase." *J Virol* **71**(4): 2996-3004.
- Lang, T., C. Lo, et al. (2011). "The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway." *J Hepatol* **55**(4): 762-769.
- Lanier, L. L. (2008). "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition." *Nat Immunol* **9**(5): 495-502.
- Lara-Pezzi, E., P. L. Majano, et al. (1998). "The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes." *Hepatology* **28**(4): 1013-1021.
- Laras, A., J. Koskinas, et al. (2006). "Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients." *Hepatology* **44**(3): 694-702.
- Lavanchy, D. (2004). "Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures." *J Viral Hepat* **11**(2): 97-107.
- Lavanchy, D. (2012). "Viral hepatitis: global goals for vaccination." *J Clin Virol* **55**(4): 296-302.

- Le Pogam, S., P. K. Chua, et al. (2005). "Exposure of RNA templates and encapsidation of spliced viral RNA are influenced by the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core antigen (HBcAg 165-173)." *J Virol* **79**(3): 1871-1887.
- Le Pogam, S. and C. Shih (2002). "Influence of a putative intermolecular interaction between core and the pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus secretion." *J Virol* **76**(13): 6510-6517.
- Le Seyec, J., P. Chouteau, et al. (1998). "Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity." *J Virol* **72**(7): 5573-5578.
- Lecluyse, E. L. and E. Alexandre (2010). "Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue." *Methods Mol Biol* **640**: 57-82.
- Lee, H. K., J. M. Lund, et al. (2007). "Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells." *Science* **315**(5817): 1398-1401.
- Lee, H. R., M. H. Kim, et al. (2009). "Viral interferon regulatory factors." *J Interferon Cytokine Res* **29**(9): 621-627.
- Lee, J., C. C. Wu, et al. (2006). "Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(6): 1828-1833.
- Lee, S. G. and H. M. Rho (2000). "Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein." *Oncogene* **19**(3): 468-471.
- Lee, S. S., B. W. Young, et al. (2002). "The implication of a reduced-dose hepatitis B vaccination schedule in low risk newborns." *Vaccine* **20**(31-32): 3752-3754.
- Leistner, C. M., S. Gruen-Bernhard, et al. (2008). "Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus." *Cell Microbiol* **10**(1): 122-133.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* **86**(6): 973-983.
- Lenhoff, R. J. and J. Summers (1994). "Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus." *J Virol* **68**(7): 4565-4571.
- Leupin, O., S. Bontron, et al. (2005). "Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death." *J Virol* **79**(7): 4238-4245.
- Levero, M., T. Pollicino, et al. (2009). "Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection." *J Hepatol* **51**(3): 581-592.
- Li, F., H. Wei, et al. (2012). "Blocking the Natural Killer Cell Inhibitory Receptor NKG2A Increases Activity of Human Natural Killer Cells and Clears Hepatitis B Virus Infection in Mice." *Gastroenterology*.



- Li, H. C., E. Y. Huang, et al. (2010). "Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles." *PLoS Pathog* **6**(10): e1001162.
- Li, J., S. Lin, et al. (2010). "Inhibition of hepatitis B virus replication by MyD88 involves accelerated degradation of pregenomic RNA and nuclear retention of pre-S/S RNAs." *J Virol* **84**(13): 6387-6399.
- Li, J. and J. H. Ou (2001). "Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor." *J Virol* **75**(18): 8400-8406.
- Li, M., Y. Xie, et al. (1995). "HNF3 binds and activates the second enhancer, ENII, of hepatitis B virus." *Virology* **214**(2): 371-378.
- Li, Y., D. Wan, et al. (2008). "Candidate genes responsible for human hepatocellular carcinoma identified from differentially expressed genes in hepatocarcinogenesis of the tree shrew (*Tupaia belangeri chinesis*)." *Hepatol Res* **38**(1): 85-95.
- Liao, W. and J. H. Ou (1995). "Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs." *J Virol* **69**(2): 1025-1029.
- Liaskou, E., D. V. Wilson, et al. (2012). "Innate immune cells in liver inflammation." *Mediators Inflamm* **2012**: 949157.
- Liaw, Y. F. and C. M. Chu (2009). "Hepatitis B virus infection." *Lancet* **373**(9663): 582-592.
- Lin, C. L. and J. H. Kao (2011). "The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances." *J Gastroenterol Hepatol* **26 Suppl 1**: 123-130.
- Lobato, C., J. Tavares-Neto, et al. (2006). "Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study." *J Gastroenterol Hepatol* **21**(5): 863-868.
- Locarnini, S. and F. Zoulim (2010). "Molecular genetics of HBV infection." *Antivir Ther* **15 Suppl 3**: 3-14.
- Loffler-Mary, H., J. Dumortier, et al. (2000). "Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins." *Virology* **270**(2): 358-367.
- Loffler-Mary, H., M. Werr, et al. (1997). "Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70." *Virology* **235**(1): 144-152.
- Longato, L., S. de la Monte, et al. (2009). "Overexpression of insulin receptor substrate-1 and hepatitis Bx genes causes premalignant alterations in the liver." *Hepatology* **49**(6): 1935-1943.
- Loo, Y. M., J. Fornek, et al. (2008). "Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity." *J Virol* **82**(1): 335-345.

- Lopes, A. R., P. Kellam, et al. (2008). "Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection." *J Clin Invest* **118**(5): 1835-1845.
- Lu, C. C., M. Chen, et al. (1995). "Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression." *Virology* **206**(2): 1155-1158.
- Lucifora, J., S. Arzberger, et al. (2011). "Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection." *J Hepatol* **55**(5): 996-1003.
- Lucifora, J., D. Durantel, et al. (2008). "Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector." *J Gen Virol* **89**(Pt 8): 1819-1828.
- Lucifora, J., D. Durantel, et al. (2010). "Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells." *Hepatology* **51**(1): 63-72.
- Lucifora, J., I. E. Vincent, et al. (2010). "Hepatitis B virus replication in primary macaque hepatocytes: crossing the species barrier toward a new small primate model." *Hepatology* **51**(6): 1954-1960.
- Lund, J., A. Sato, et al. (2003). "Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* **198**(3): 513-520.
- Luo, L., S. Chen, et al. (2013). "Hepatitis B virus X protein modulates remodelling of minichromosomes related to hepatitis B virus replication in HepG2 cells." *Int J Mol Med* **31**(1): 197-204.
- Lutgehetmann, M., L. V. Mancke, et al. (2012). "Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation." *Hepatology* **55**(3): 685-694.
- Mabit, H. and H. Schaller (2000). "Intracellular hepadnavirus nucleocapsids are selected for secretion by envelope protein-independent membrane binding." *J Virol* **74**(24): 11472-11478.
- Maccallum, F. O. (1946). "Homologous Serum Hepatitis." *Proc R Soc Med* **39**(10): 655-657.
- Majano, P., E. Lara-Pezzi, et al. (2001). "Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation." *Hepatology* **34**(6): 1218-1224.
- Mancini-Bourgine, M., F. Bayard, et al. (2007). "Hepatitis B virus splice-generated protein induces T-cell responses in HLA-transgenic mice and hepatitis B virus-infected patients." *J Virol* **81**(10): 4963-4972.
- Mancini-Bourgine, M., H. Fontaine, et al. (2004). "Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers." *Hepatology* **40**(4): 874-882.

- Mancini, M., M. Hadchouel, et al. (1996). "DNA-mediated immunization in a transgenic mouse model of the hepatitis B surface antigen chronic carrier state." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12496-12501.
- Mao, Y., L. Da, et al. (2011). "Hepatitis B virus X protein reduces starvation-induced cell death through activation of autophagy and inhibition of mitochondrial apoptotic pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **415**(1): 68-74.
- Marcellin, P. (2009). "Hepatitis B and hepatitis C in 2009." *Liver Int* **29 Suppl 1**: 1-8.
- Marion, M. J., O. Hantz, et al. (2010). "The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies." *Methods Mol Biol* **640**: 261-272.
- Marion, P. L., S. S. Knight, et al. (1984). "Liver disease associated with duck hepatitis B virus infection of domestic ducks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(3): 898-902.
- Marsh, M. and A. Helenius (2006). "Virus entry: open sesame." *Cell* **124**(4): 729-740.
- Martinet, J., T. Dufeu-Duchesne, et al. (2012). "Altered functions of plasmacytoid dendritic cells and reduced cytolytic activity of natural killer cells in patients with chronic HBV infection." *Gastroenterology* **143**(6): 1586-1596 e1588.
- Martinon, F., A. Mayor, et al. (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." *Annu Rev Immunol* **27**: 229-265.
- Maruyama, T., A. McLachlan, et al. (1993). "The serology of chronic hepatitis B infection revisited." *J Clin Invest* **91**(6): 2586-2595.
- Marx, V. (2012). "Epigenetics: Reading the second genomic code." *Nature* **491**(7422): 143-147.
- Mason, W. S., C. Aldrich, et al. (1982). "Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(13): 3997-4001.
- McCabe, M. T., H. M. Ott, et al. (2012). "EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations." *Nature* **492**(7427): 108-112.
- McCaffrey, A. P., H. Nakai, et al. (2003). "Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference." *Nat Biotechnol* **21**(6): 639-644.
- McClain, S. L., A. J. Clippinger, et al. (2007). "Hepatitis B virus replication is associated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels." *J Virol* **81**(21): 12061-12065.
- McClary, H., R. Koch, et al. (2000). "Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines." *J Virol* **74**(5): 2255-2264.

- McMahon, B. J., W. L. Alward, et al. (1985). "Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state." *J Infect Dis* **151**(4): 599-603.
- Meager, A., K. Visvalingam, et al. (2005). "Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons." *Cytokine* **31**(2): 109-118.
- Meier, A., S. Mehrle, et al. (2012). "Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes." *Hepatology*.
- Melegari, M., S. K. Wolf, et al. (2005). "Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression." *J Virol* **79**(15): 9810-9820.
- Menne, S. and P. J. Cote (2007). "The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection." *World J Gastroenterol* **13**(1): 104-124.
- Messageot, F., S. Salhi, et al. (2003). "Proteolytic processing of the hepatitis B virus e antigen precursor. Cleavage at two furin consensus sequences." *J Biol Chem* **278**(2): 891-895.
- Micco, L., D. Peppia, et al. (2013). "Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B." *J Hepatol* **58**(2): 225-233.
- Michel, M. L., Q. Deng, et al. (2011). "Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: perspectives and challenges." *J Hepatol* **54**(6): 1286-1296.
- Milich, D. and T. J. Liang (2003). "Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection." *Hepatology* **38**(5): 1075-1086.
- Milich, D. R., J. E. Jones, et al. (1990). "Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(17): 6599-6603.
- Miller, R. H. and W. S. Robinson (1986). "Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(8): 2531-2535.
- Moolla, N., M. Kew, et al. (2002). "Regulatory elements of hepatitis B virus transcription." *J Viral Hepat* **9**(5): 323-331.
- Moraleda, G., J. Saputelli, et al. (1997). "Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus." *J Virol* **71**(12): 9392-9399.
- Munshi, N., Y. Yie, et al. (1999). "The IFN-beta enhancer: a paradigm for understanding activation and repression of inducible gene expression." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**: 149-159.

- Murakami, S. (2001). "Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator." *J Gastroenterol* **36**(10): 651-660.
- Murakami, Y., K. Saigo, et al. (2005). "Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas." *Gut* **54**(8): 1162-1168.
- Murawski, M. R., G. N. Bowen, et al. (2009). "Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2." *J Virol* **83**(3): 1492-1500.
- Murray, J. M., S. F. Wieland, et al. (2005). "Dynamics of hepatitis B virus clearance in chimpanzees." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17780-17785.
- Nakagawa, S., Y. Hirata, et al. (2013). "Targeted Induction of Interferon-lambda in Humanized Chimeric Mouse Liver Abrogates Hepatotropic Virus Infection." *PLoS One* **8**(3): e59611.
- Naoumov, N. V., B. C. Portmann, et al. (1990). "Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B infection." *Gastroenterology* **99**(4): 1248-1253.
- Narayan, R., T. Buronfosse, et al. (2006). "Rise in gamma interferon expression during resolution of duck hepatitis B virus infection." *J Gen Virol* **87**(Pt 11): 3225-3232.
- Nassal, M. (1992). "The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly." *J Virol* **66**(7): 4107-4116.
- Nassal, M. (1999). "Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions." *Intervirology* **42**(2-3): 100-116.
- Nassal, M. (2008). "Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way." *Virus Res* **134**(1-2): 235-249.
- Nassal, M., A. Rieger, et al. (1992). "Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking." *J Mol Biol* **225**(4): 1013-1025.
- Nguyen, D. H. and J. Hu (2008). "Reverse transcriptase- and RNA packaging signal-dependent incorporation of APOBEC3G into hepatitis B virus nucleocapsids." *J Virol* **82**(14): 6852-6861.
- Nguyen, T., P. Desmond, et al. (2009). "The role of quantitative hepatitis B serology in the natural history and management of chronic hepatitis B." *Hepatol Int* **3**(Suppl 1): 5-15.
- Niller, H. H., H. Wolf, et al. (2009). "Epigenetic dysregulation of the host cell genome in Epstein-Barr virus-associated neoplasia." *Semin Cancer Biol* **19**(3): 158-164.
- Nishimura, M. and S. Naito (2005). "Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes." *Biol Pharm Bull* **28**(5): 886-892.



- Nitiss, K. C., M. Malik, et al. (2006). "Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) participates in the repair of Top2-mediated DNA damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(24): 8953-8958.
- Nunez, E., B. Yelamos, et al. (2009). "Interaction of preS domains of hepatitis B virus with phospholipid vesicles." *Biochim Biophys Acta* **1788**(2): 417-424.
- O'Quinn, D. B., M. T. Palmer, et al. (2008). "Emergence of the Th17 pathway and its role in host defense." *Adv Immunol* **99**: 115-163.
- Oess, S. and E. Hildt (2000). "Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens." *Gene Ther* **7**(9): 750-758.
- Ohba, K., M. Mizokami, et al. (1995). "Relationships between serotypes and genotypes of hepatitis B virus: genetic classification of HBV by use of surface genes." *Virus Res* **39**(1): 25-34.
- Ojaniemi, M., M. Liljeroos, et al. (2006). "TLR-2 is upregulated and mobilized to the hepatocyte plasma membrane in the space of Disse and to the Kupffer cells TLR-4 dependently during acute endotoxemia in mice." *Immunol Lett* **102**(2): 158-168.
- Okamoto, H., M. Imai, et al. (1987). "Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission." *Jpn J Exp Med* **57**(4): 231-236.
- Okamoto, H., F. Tsuda, et al. (1988). "Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes." *J Gen Virol* **69** ( Pt 10): 2575-2583.
- Omata, M., K. Uchiumi, et al. (1983). "Duck hepatitis B virus and liver diseases." *Gastroenterology* **85**(2): 260-267.
- Onoguchi, K., M. Yoneyama, et al. (2007). "Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism." *J Biol Chem* **282**(10): 7576-7581.
- Oquendo, J., S. Karray, et al. (1997). "Effect of hepatitis B virus on tumour necrosis factor (TNF alpha) gene expression in human THP-1 monocytic and Namalwa B-cell lines." *Res Immunol* **148**(6): 399-409.
- Ori, A. and Y. Shaul (1995). "Hepatitis B virus enhancer binds and is activated by the Hepatocyte nuclear factor 3." *Virology* **207**(1): 98-106.
- Ozen, C., G. Yildiz, et al. (2013). "Genetics and epigenetics of liver cancer." *N Biotechnol*.
- Pagliaccetti, N. E., E. N. Chu, et al. (2010). "Lambda and alpha interferons inhibit hepatitis B virus replication through a common molecular mechanism but with different in vivo activities." *Virology* **401**(2): 197-206.
- Pancholi, P., D. H. Lee, et al. (2001). "DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee." *Hepatology* **33**(2): 448-454.

- Paran, N., B. Geiger, et al. (2001). "HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment." *EMBO J* **20**(16): 4443-4453.
- Parent, R., M. J. Marion, et al. (2004). "Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line." *Gastroenterology* **126**(4): 1147-1156.
- Park, I. Y., B. H. Sohn, et al. (2007). "Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein." *Gastroenterology* **132**(4): 1476-1494.
- Park, S. G., Y. Kim, et al. (2003). "Fidelity of hepatitis B virus polymerase." *Eur J Biochem* **270**(14): 2929-2936.
- Patel, C. V., I. Handy, et al. (2000). "PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR." *J Biol Chem* **275**(48): 37993-37998.
- Paterlini-Brechot, P., K. Saigo, et al. (2003). "Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene." *Oncogene* **22**(25): 3911-3916.
- Patient, R., C. Hourieux, et al. (2009). "Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles." *Cell Microbiol* **11**(11): 1561-1570.
- Paun, A. and P. M. Pitha (2007). "The IRF family, revisited." *Biochimie* **89**(6-7): 744-753.
- Pelte kian, C., E. Gordien, et al. (2005). "Human MxA protein participates to the interferon-related inhibition of hepatitis B virus replication in female transgenic mice." *J Hepatol* **43**(6): 965-972.
- Pepp a, D., L. Micco, et al. (2010). "Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection." *PLoS Pathog* **6**(12): e1001227.
- Perlman, D. and J. Hu (2003). "Duck hepatitis B virus virion secretion requires a double-stranded DNA genome." *J Virol* **77**(3): 2287-2294.
- Perlman, D. H., E. A. Berg, et al. (2005). "Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(25): 9020-9025.
- Perrillo, R. (2009). "Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B." *Hepatology* **49**(5 Suppl): S103-111.
- Perrillo, R. P. (2001). "Acute flares in chronic hepatitis B: the natural and unnatural history of an immunologically mediated liver disease." *Gastroenterology* **120**(4): 1009-1022.
- Persing, D. H., H. E. Varmus, et al. (1986). "Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide." *Science* **234**(4782): 1388-1391.



- Persing, D. H., H. E. Varmus, et al. (1987). "The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid." *J Virol* **61**(5): 1672-1677.
- Peternel, S. and M. Kastelan (2009). "Immunopathogenesis of psoriasis: focus on natural killer T cells." *J Eur Acad Dermatol Venereol* **23**(10): 1123-1127.
- Petersen, N. J., D. H. Barrett, et al. (1976). "Hepatitis B surface antigen in saliva, impetiginous lesions, and the environment in two remote Alaskan villages." *Appl Environ Microbiol* **32**(4): 572-574.
- Peterson, D. L., N. Nath, et al. (1982). "Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety." *J Biol Chem* **257**(17): 10414-10420.
- Pichlmair, A., O. Schulz, et al. (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." *Science* **314**(5801): 997-1001.
- Poisson, F., A. Severac, et al. (1997). "Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle." *Virology* **228**(1): 115-120.
- Pollack, J. R. and D. Ganem (1993). "An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation." *J Virol* **67**(6): 3254-3263.
- Pollack, J. R. and D. Ganem (1994). "Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis." *J Virol* **68**(9): 5579-5587.
- Pollicino, T., L. Belloni, et al. (2006). "Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones." *Gastroenterology* **130**(3): 823-837.
- Pollicino, T., A. Vegetti, et al. (2013). "Hepatitis B virus DNA integration in tumour tissue of a non-cirrhotic HFE-haemochromatosis patient with hepatocellular carcinoma." *J Hepatol* **58**(1): 190-193.
- Ponsel, D. and V. Bruss (2003). "Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation." *J Virol* **77**(1): 416-422.
- Poovorawan, Y., V. Chongsrisawat, et al. (2011). "Evidence of protection against clinical and chronic hepatitis B infection 20 years after infant vaccination in a high endemicity region." *J Viral Hepat* **18**(5): 369-375.
- Possehl, C., R. Repp, et al. (1992). "Absence of free core antigen in anti-HBc negative viremic hepatitis B carriers." *Arch Virol Suppl* **4**: 39-41.
- Pourquier, P., A. D. Jensen, et al. (1999). "Human DNA topoisomerase I-mediated cleavage and recombination of duck hepatitis B virus DNA in vitro." *Nucleic Acids Res* **27**(8): 1919-1925.

- Prassolov, A., H. Hohenberg, et al. (2003). "New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range." *J Virol* **77**(3): 1964-1976.
- Protzer, U., M. K. Maini, et al. (2012). "Living in the liver: hepatic infections." *Nat Rev Immunol* **12**(3): 201-213.
- Pult, I., H. J. Netter, et al. (2001). "Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks." *Virology* **289**(1): 114-128.
- Quasdorff, M. and U. Protzer (2010). "Control of hepatitis B virus at the level of transcription." *J Viral Hepat* **17**(8): 527-536.
- Rabe, B., M. Delaleau, et al. (2009). "Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids." *PLoS Pathog* **5**(8): e1000563.
- Rabe, B., D. Glebe, et al. (2006). "Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events." *J Virol* **80**(11): 5465-5473.
- Rabe, B., A. Vlachou, et al. (2003). "Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 9849-9854.
- Radziwill, G., W. Tucker, et al. (1990). "Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity." *J Virol* **64**(2): 613-620.
- Raimondo, G., G. Caccamo, et al. (2013). "Occult HBV infection." *Semin Immunopathol* **35**(1): 39-52.
- Rallabhandi, P., R. L. Phillips, et al. (2012). "Respiratory syncytial virus fusion protein-induced toll-like receptor 4 (TLR4) signaling is inhibited by the TLR4 antagonists *Rhodobacter sphaeroides* lipopolysaccharide and eritoran (E5564) and requires direct interaction with MD-2." *MBio* **3**(4).
- Randall, R. E. and S. Goodbourn (2008). "Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures." *J Gen Virol* **89**(Pt 1): 1-47.
- Raney, A. K., A. J. Easton, et al. (1994). "Characterization of the minimal elements of the hepatitis B virus large surface antigen promoter." *J Gen Virol* **75** ( Pt 10): 2671-2679.
- Raney, A. K., P. Zhang, et al. (1995). "Regulation of transcription from the hepatitis B virus large surface antigen promoter by hepatocyte nuclear factor 3." *J Virol* **69**(6): 3265-3272.
- Rassa, J. C., J. L. Meyers, et al. (2002). "Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2281-2286.
- Rauschhuber, C., N. Noske, et al. (2012). "New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells." *Eur J Cell Biol* **91**(1): 2-9.

- Rehermann, B. and M. Nascimbeni (2005). "Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection." *Nat Rev Immunol* **5**(3): 215-229.
- Rhim, J. A., E. P. Sandgren, et al. (1994). "Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation." *Science* **263**(5150): 1149-1152.
- Rizzetto, M. (2009). "Hepatitis D: thirty years after." *J Hepatol* **50**(5): 1043-1050.
- Robek, M. D., B. S. Boyd, et al. (2004). "Signal transduction pathways that inhibit hepatitis B virus replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(6): 1743-1747.
- Rodriguez-Crespo, I., E. Nunez, et al. (1999). "Fusogenic activity of hepadnavirus peptides corresponding to sequences downstream of the putative cleavage site." *Virology* **261**(1): 133-142.
- Roingeard, P. and C. Sureau (1998). "Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis." *Hepatology* **28**(4): 1128-1133.
- Romagne, F. (2007). "Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors." *Drug Discov Today* **12**(1-2): 80-87.
- Roseman, A. M., J. A. Berriman, et al. (2005). "A structural model for maturation of the hepatitis B virus core." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44): 15821-15826.
- Rosmorduc, O., H. Sirma, et al. (1999). "Inhibition of interferon-inducible MxA protein expression by hepatitis B virus capsid protein." *J Gen Virol* **80** ( Pt 5): 1253-1262.
- Saade, F., T. Buronfosse, et al. (2008). "Enhancement of neutralizing humoral response of DNA vaccine against duck hepatitis B virus envelope protein by co-delivery of cytokine genes." *Vaccine* **26**(40): 5159-5164.
- Sablan, B. P., D. J. Kim, et al. (2012). "Demonstration of safety and enhanced seroprotection against hepatitis B with investigational HBsAg-1018 ISS vaccine compared to a licensed hepatitis B vaccine." *Vaccine* **30**(16): 2689-2696.
- Sall, A. A., S. Starkman, et al. (2005). "Frequent infection of *Hylobates pileatus* (pileated gibbon) with species-associated variants of hepatitis B virus in Cambodia." *J Gen Virol* **86**(Pt 2): 333-337.
- Samuel, C. E. (2001). "Antiviral actions of interferons." *Clin Microbiol Rev* **14**(4): 778-809, table of contents.
- Satoh, T., H. Kato, et al. (2010). "LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(4): 1512-1517.
- Sauter, D., A. Specht, et al. (2010). "Tetherin: holding on and letting go." *Cell* **141**(3): 392-398.
- Schadler, S. and E. Hildt (2009). "HBV life cycle: entry and morphogenesis." *Viruses* **1**(2): 185-209.

- Schaefer, S. (2007). "Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes." *World J Gastroenterol* **13**(1): 14-21.
- Schieck, A., T. Muller, et al. (2010). "Solid-phase synthesis of the lipopeptide Myr-HBVpreS/2-78, a hepatitis B virus entry inhibitor." *Molecules* **15**(7): 4773-4783.
- Schmidt, A., T. Schwerd, et al. (2009). "5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(29): 12067-12072.
- Schmitt, S., D. Glebe, et al. (2004). "Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus." *J Gen Virol* **85**(Pt 7): 2045-2053.
- Schmitz, A., A. Schwarz, et al. (2010). "Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket." *PLoS Pathog* **6**(1): e1000741.
- Schroder, M. (2011). "Viruses and the human DEAD-box helicase DDX3: inhibition or exploitation?" *Biochem Soc Trans* **39**(2): 679-683.
- Schulte-Frohlind, E., B. Seidler, et al. (2002). "Different activities of type I interferons on hepatitis B virus core promoter regulated transcription." *Cytokine* **17**(4): 214-220.
- Schulze, A., P. Gripon, et al. (2007). "Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans." *Hepatology* **46**(6): 1759-1768.
- Schulze, A., K. Mills, et al. (2012). "Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus." *Hepatology* **55**(2): 373-383.
- Schuster, R., W. H. Gerlich, et al. (2000). "Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts." *Oncogene* **19**(9): 1173-1180.
- Seeger, C. and W. S. Mason (2000). "Hepatitis B virus biology." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(1): 51-68.
- Seifer, M., R. K. Hamatake, et al. (1998). "In vitro inhibition of hepadnavirus polymerases by the triphosphates of BMS-200475 and lobucavir." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(12): 3200-3208.
- Seitz, S., S. Urban, et al. (2007). "Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions." *Embo J* **26**(18): 4160-4167.
- Seki, S., Y. Habu, et al. (2000). "The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses." *Immunol Rev* **174**: 35-46.
- Sells, M. A., M. L. Chen, et al. (1987). "Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(4): 1005-1009.

- Sells, M. A., A. Z. Zelent, et al. (1988). "Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions." *J Virol* **62**(8): 2836-2844.
- Sheppard, P., W. Kindsvogel, et al. (2003). "IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R." *Nat Immunol* **4**(1): 63-68.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." *Nat Rev Immunol* **2**(6): 389-400.
- Shi, C. C., E. T. Tjwa, et al. (2012). "Hepatitis B virus suppresses the functional interaction between natural killer cells and plasmacytoid dendritic cells." *J Viral Hepat* **19**(2): e26-33.
- Shin, M. K., J. Lee, et al. (2004). "A novel cis-acting element facilitates minus-strand DNA synthesis during reverse transcription of the hepatitis B virus genome." *J Virol* **78**(12): 6252-6262.
- Simons, J. N., T. P. Leary, et al. (1995). "Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis." *Nat Med* **1**(6): 564-569.
- Singh, V. V., N. Kerur, et al. (2013). "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency in Endothelial and B Cells Activates Gamma Interferon-Inducible Protein 16-Mediated Inflammasomes." *J Virol* **87**(8): 4417-4431.
- Sommereyns, C., S. Paul, et al. (2008). "IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000017.
- Sorensen, L. N., L. S. Reinert, et al. (2008). "TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain." *J Immunol* **181**(12): 8604-8612.
- Soussan, P., R. Tuveri, et al. (2003). "The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis." *J Hepatol* **38**(3): 343-348.
- Stacey, A. R., P. J. Norris, et al. (2009). "Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections." *J Virol* **83**(8): 3719-3733.
- Stahl, M., J. Beck, et al. (2007). "Chaperones activate hepadnavirus reverse transcriptase by transiently exposing a C-proximal region in the terminal protein domain that contributes to epsilon RNA binding." *J Virol* **81**(24): 13354-13364.
- Starkel, P., M. Stoffel, et al. (2005). "Response to an experimental HBV vaccine permits withdrawal of HBIG prophylaxis in fulminant and selected chronic HBV-infected liver graft recipients." *Liver Transpl* **11**(10): 1228-1234.
- Steitz, T. A. (2006). "Visualizing polynucleotide polymerase machines at work." *Embo J* **25**(15): 3458-3468.



- Stibbe, W. and W. H. Gerlich (1983). "Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen." *J Virol* **46**(2): 626-628.
- Stoeckl, L., A. Funk, et al. (2006). "Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6730-6734.
- Su, Q., C. H. Schroder, et al. (1998). "Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas." *Hepatology* **27**(4): 1109-1120.
- Summers, J. and W. S. Mason (1982). "Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate." *Cell* **29**(2): 403-415.
- Summers, J. and W. S. Mason (2004). "Residual integrated viral DNA after hepadnavirus clearance by nucleoside analog therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(2): 638-640.
- Summers, J., P. M. Smith, et al. (1990). "Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification." *J Virol* **64**(6): 2819-2824.
- Sun, D. and M. Nassal (2006). "Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus." *J Hepatol* **45**(5): 636-645.
- Sun, W., Y. Li, et al. (2009). "ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(21): 8653-8658.
- Sureau, C. (2006). "The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle." *Curr Top Microbiol Immunol* **307**: 113-131.
- Swiecki, M., N. S. Omattage, et al. (2013). "BST-2/tetherin: structural biology, viral antagonism, and immunobiology of a potent host antiviral factor." *Mol Immunol* **54**(2): 132-139.
- Tabeta, K., P. Georgel, et al. (2004). "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10): 3516-3521.
- Takada, S., N. Kaneniwa, et al. (1996). "Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system." *Virology* **216**(1): 80-89.
- Takada, S., N. Kaneniwa, et al. (1997). "Cytoplasmic retention of the p53 tumor suppressor gene product is observed in the hepatitis B virus X gene-transfected cells." *Oncogene* **15**(16): 1895-1901.
- Takaoka, A., Z. Wang, et al. (2007). "DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response." *Nature* **448**(7152): 501-505.

- Tang, H. and A. McLachlan (2002). "A pregenomic RNA sequence adjacent to DR1 and complementary to epsilon influences hepatitis B virus replication efficiency." *Virology* **303**(1): 199-210.
- Tang, H., N. Oishi, et al. (2006). "Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein." *Cancer Sci* **97**(10): 977-983.
- Taniguchi, T., K. Ogasawara, et al. (2001). "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." *Annu Rev Immunol* **19**: 623-655.
- Teng, T. S., S. S. Foo, et al. (2012). "Viperin restricts chikungunya virus replication and pathology." *J Clin Invest* **122**(12): 4447-4460.
- Tenney, D. J., S. M. Levine, et al. (2004). "Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(9): 3498-3507.
- Terradillos, O., T. Pollicino, et al. (1998). "p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro." *Oncogene* **17**(16): 2115-2123.
- Thimme, R., S. Wieland, et al. (2003). "CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection." *J Virol* **77**(1): 68-76.
- Thompson, A. J., D. Colledge, et al. (2009). "Stimulation of the interleukin-1 receptor and Toll-like receptor 2 inhibits hepatitis B virus replication in hepatoma cell lines in vitro." *Antivir Ther* **14**(6): 797-808.
- Thompson, J. M. and A. Iwasaki (2008). "Toll-like receptors regulation of viral infection and disease." *Adv Drug Deliv Rev* **60**(7): 786-794.
- Thomson, A. W. and P. A. Knolle (2010). "Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment." *Nat Rev Immunol* **10**(11): 753-766.
- Tjwa, E. T., G. W. van Oord, et al. (2011). "Viral load reduction improves activation and function of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B." *J Hepatol* **54**(2): 209-218.
- Tong, M. J. and J. Trieu (2013). "Hepatitis B "inactive carriers": Clinical course and outcomes." *J Dig Dis*.
- Toscano, F., Y. Estornes, et al. (2013). "Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor." *J Immunol* **190**(2): 764-773.
- Tripp, C. S., S. F. Wolf, et al. (1993). "Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3725-3729.
- Tur-Kaspa, R., L. Teicher, et al. (1990). "Alpha interferon suppresses hepatitis B virus enhancer activity and reduces viral gene transcription." *J Virol* **64**(4): 1821-1824.



- Turelli, P., A. Liagre-Quazzola, et al. (2008). "APOBEC3-independent interferon-induced viral clearance in hepatitis B virus transgenic mice." *J Virol* **82**(13): 6585-6590.
- Tuttleman, J. S., C. Pourcel, et al. (1986). "Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells." *Cell* **47**(3): 451-460.
- Twu, J. S., C. H. Lee, et al. (1988). "Hepatitis B virus suppresses expression of human beta-interferon." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(1): 252-256.
- Uhrig, A., R. Banafsche, et al. (2005). "Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver." *J Leukoc Biol* **77**(5): 626-633.
- Unterholzner, L. and A. G. Bowie (2011). "Innate DNA sensing moves to the nucleus." *Cell Host Microbe* **9**(5): 351-353.
- Uprichard, S. L., S. F. Wieland, et al. (2003). "Transcriptional and posttranscriptional control of hepatitis B virus gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 1310-1315.
- Urban, S. and P. Gripon (2002). "Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein." *J Virol* **76**(4): 1986-1990.
- Vanlandschoot, P., F. Van Houtte, et al. (2005). "The arginine-rich carboxy-terminal domain of the hepatitis B virus core protein mediates attachment of nucleocapsids to cell-surface-expressed heparan sulfate." *J Gen Virol* **86**(Pt 1): 75-84.
- Vedadi, M., D. Barsyte-Lovejoy, et al. (2011). "A chemical probe selectively inhibits G9a and GLP methyltransferase activity in cells." *Nat Chem Biol* **7**(8): 566-574.
- Venook, A. P., C. Papandreou, et al. (2010). "The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective." *Oncologist* **15 Suppl 4**: 5-13.
- Verschoor, E. J., K. S. Warren, et al. (2001). "Analysis of two genomic variants of orang-utan hepadnavirus and their relationship to other primate hepatitis B-like viruses." *J Gen Virol* **82**(Pt 4): 893-897.
- Vigan, R. and S. J. Neil (2010). "Determinants of tetherin antagonism in the transmembrane domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein." *J Virol* **84**(24): 12958-12970.
- Vincent, I. E., C. Zannetti, et al. (2011). "Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells." *PLoS One* **6**(10): e26315.
- Visvanathan, K., N. A. Skinner, et al. (2007). "Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein." *Hepatology* **45**(1): 102-110.
- Vogel, S. N., K. A. Fitzgerald, et al. (2003). "TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression." *Mol Interv* **3**(8): 466-477.

- Volz, T., L. Allweiss, et al. (2012). "The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus." *J Hepatol*.
- von Schwedler, U. K., M. Stuchell, et al. (2003). "The protein network of HIV budding." *Cell* **114**(6): 701-713.
- Walsh, A. W., D. R. Langley, et al. (2010). "Mechanistic characterization and molecular modeling of hepatitis B virus polymerase resistance to entecavir." *PLoS One* **5**(2): e9195.
- Walsh, R. and S. Locarnini (2012). "Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise." *Yonsei Med J* **53**(5): 875-885.
- Walsh, R., S. Nuttall, et al. (2011). "Targeting the hepatitis B virus precore antigen with a novel IgNAR single variable domain intrabody." *Virology* **411**(1): 132-141.
- Walter, E., R. Keist, et al. (1996). "Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo." *Hepatology* **24**(1): 1-5.
- Wang, B., X. P. Zhao, et al. (2013). "IL-17A but not IL-22 suppresses the replication of hepatitis B virus mediated by over-expression of MxA and OAS mRNA in the HepG2.2.15 cell line." *Antiviral Res* **97**(3): 285-292.
- Wang, H. and W. S. Ryu (2010). "Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor signaling via interaction with DDX3: implications for immune evasion." *PLoS Pathog* **6**(7): e1000986.
- Wang, J., X. Chenivresse, et al. (1990). "Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma." *Nature* **343**(6258): 555-557.
- Wang, J. C., M. S. Dhason, et al. (2012). "Structural organization of pregenomic RNA and the carboxy-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus." *PLoS Pathog* **8**(9): e1002919.
- Wang, S. H., S. H. Yeh, et al. (2012). "Estrogen receptor alpha represses transcription of HBV genes via interaction with hepatocyte nuclear factor 4alpha." *Gastroenterology* **142**(4): 989-998 e984.
- Wang, W. H., L. L. Studach, et al. (2011). "Proteins ZNF198 and SUZ12 are down-regulated in hepatitis B virus (HBV) X protein-mediated hepatocyte transformation and in HBV replication." *Hepatology* **53**(4): 1137-1147.
- Wang, X., E. R. Hinson, et al. (2007). "The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts." *Cell Host Microbe* **2**(2): 96-105.
- Wang, X., Y. Li, et al. (2010). "Hepatitis B virus X protein suppresses virus-triggered IRF3 activation and IFN-beta induction by disrupting the VISA-associated complex." *Cell Mol Immunol* **7**(5): 341-348.

- Waris, G. and A. Siddiqui (2002). "Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function." *J Virol* **76**(6): 2721-2729.
- Watanabe, T., E. M. Sorensen, et al. (2007). "Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10205-10210.
- Watts, N. R., J. F. Conway, et al. (2011). "Role of the propeptide in controlling conformation and assembly state of hepatitis B virus e-antigen." *J Mol Biol* **409**(2): 202-213.
- Weber, O., K. H. Schlemmer, et al. (2002). "Inhibition of human hepatitis B virus (HBV) by a novel non-nucleosidic compound in a transgenic mouse model." *Antiviral Res* **54**(2): 69-78.
- Wei, C., C. Ni, et al. (2010). "The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein." *J Immunol* **185**(2): 1158-1168.
- Wei, X., C. Tan, et al. (2013). "Epigenetic repression of miR-132 expression by the hepatitis B virus x protein in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma." *Cell Signal*.
- Wei, Y., J. E. Tavis, et al. (1996). "Relationship between viral DNA synthesis and virion envelopment in hepatitis B viruses." *J Virol* **70**(9): 6455-6458.
- Weigand, K., A. Knaust, et al. (2010). "Assembly and export determine the intracellular distribution of hepatitis B virus core protein subunits." *J Gen Virol* **91**(Pt 1): 59-67.
- Whitten, T. M., A. T. Quets, et al. (1991). "Identification of the hepatitis B virus factor that inhibits expression of the beta interferon gene." *J Virol* **65**(9): 4699-4704.
- Wieland, S., R. Thimme, et al. (2004). "Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6669-6674.
- Wieland, S. F. and F. V. Chisari (2005). "Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses." *J Virol* **79**(15): 9369-9380.
- Wieland, S. F., A. Eustaquio, et al. (2005). "Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(28): 9913-9917.
- Wieland, S. F., R. G. Vega, et al. (2003). "Searching for interferon-induced genes that inhibit hepatitis B virus replication in transgenic mouse hepatocytes." *J Virol* **77**(2): 1227-1236.
- Wilkins, C. and M. Gale, Jr. (2010). "Recognition of viruses by cytoplasmic sensors." *Curr Opin Immunol* **22**(1): 41-47.
- Wittkop, L., A. Schwarz, et al. (2010). "Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation." *Cell Microbiol* **12**(7): 962-975.

- Woltman, A. M., M. L. Op den Brouw, et al. (2011). "Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function." *PLoS One* **6**(1): e15324.
- Wounderlich, G. and V. Bruss (1996). "Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers." *Arch Virol* **141**(7): 1191-1205.
- Wu, D. L., G. H. Xu, et al. (2013). "Correlation of AIM2 expression in peripheral blood mononuclear cells from humans with acute and chronic hepatitis B." *Hum Immunol* **74**(5): 514-521.
- Wu, J., M. Lu, et al. (2007). "Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice." *Hepatology* **46**(6): 1769-1778.
- Wu, J., Z. Meng, et al. (2009). "Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells." *Hepatology* **49**(4): 1132-1140.
- Wu, M., Y. Xu, et al. (2007). "Hepatitis B virus polymerase inhibits the interferon-inducible MyD88 promoter by blocking nuclear translocation of Stat1." *J Gen Virol* **88**(Pt 12): 3260-3269.
- Wu, S., T. Kanda, et al. (2012). "Hepatitis B virus e antigen physically associates with receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 and regulates IL-6 gene expression." *J Infect Dis* **206**(3): 415-420.
- Wu, W., J. Li, et al. (2010). "Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients." *J Gastroenterol Hepatol* **25**(4): 750-757.
- Xing, L., C. Liang, et al. (2011). "Coordinate roles of Gag and RNA helicase A in promoting the annealing of formula to HIV-1 RNA." *J Virol* **85**(4): 1847-1860.
- Xiong, X., C. Flores, et al. (1998). "Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro." *Hepatology* **28**(6): 1669-1673.
- Xu, C., H. Guo, et al. (2010). "Interferons accelerate decay of replication-competent nucleocapsids of hepatitis B virus." *J Virol* **84**(18): 9332-9340.
- Xu, C. F., C. H. Yu, et al. (2007). "Association of the frequency of peripheral natural killer T cells with nonalcoholic fatty liver disease." *World J Gastroenterol* **13**(33): 4504-4508.
- Xu, D., J. Fu, et al. (2006). "Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B." *J Immunol* **177**(1): 739-747.
- Xu, Y., Y. Hu, et al. (2009). "HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells." *Mol Immunol* **46**(13): 2640-2646.

- Yaginuma, K. and K. Koike (1989). "Identification of a promoter region for 3.6-kilobase mRNA of hepatitis B virus and specific cellular binding protein." *J Virol* **63**(7): 2914-2920.
- Yan, H., G. Zhong, et al. (2012). "Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus." *Elife* **1**: e00049.
- Yan, Z. H., Y. Fan, et al. (2012). "Relationship between HLA-DR gene polymorphisms and outcomes of hepatitis B viral infections: a meta-analysis." *World J Gastroenterol* **18**(24): 3119-3128.
- Yang, J. D., W. R. Kim, et al. (2011). "Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma." *Clin Gastroenterol Hepatol* **9**(1): 64-70.
- Yang, P., H. An, et al. (2010). "The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway." *Nat Immunol* **11**(6): 487-494.
- Yang, P. L., A. Althage, et al. (2002). "Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13825-13830.
- Yang, P. L., A. Althage, et al. (2010). "Immune effectors required for hepatitis B virus clearance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(2): 798-802.
- Yang, W. and J. Summers (1998). "Infection of ducklings with virus particles containing linear double-stranded duck hepatitis B virus DNA: illegitimate replication and reversion." *J Virol* **72**(11): 8710-8717.
- Yoshio, S., T. Kanto, et al. (2012). "Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus." *Hepatology*.
- Yu, S., J. Chen, et al. (2010). "Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3." *J Gen Virol* **91**(Pt 8): 2080-2090.
- Yu, X. and J. E. Mertz (1996). "Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated." *J Virol* **70**(12): 8719-8726.
- Yu, X. and J. E. Mertz (1997). "Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily." *J Virol* **71**(12): 9366-9374.
- Yuen, M. F., E. Sablon, et al. (2002). "Relationship between the development of precore and core promoter mutations and hepatitis B e antigen seroconversion in patients with chronic hepatitis B virus." *J Infect Dis* **186**(9): 1335-1338.



- Yuh, C. H. and L. P. Ting (1990). "The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function." *J Virol* **64**(9): 4281-4287.
- Zarembek, K. A. and P. J. Godowski (2002). "Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines." *J Immunol* **168**(2): 554-561.
- Zhang, J. Y., C. H. Song, et al. (2010). "Decreased ratio of Treg cells to Th17 cells correlates with HBV DNA suppression in chronic hepatitis B patients undergoing entecavir treatment." *PLoS One* **5**(11): e13869.
- Zhang, J. Y., Z. Zhang, et al. (2010). "Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B." *Hepatology* **51**(1): 81-91.
- Zhang, S. Y., E. Jouanguy, et al. (2007). "TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis." *Science* **317**(5844): 1522-1527.
- Zhang, X., A. Kraft, et al. (2012). "Preclinical development of TLR ligands as drugs for the treatment of chronic viral infections." *Expert Opin Drug Discov* **7**(7): 597-611.
- Zhang, X., Z. Meng, et al. (2009). "Lipopolysaccharide-induced innate immune responses in primary hepatocytes downregulates woodchuck hepatitis virus replication via interferon-independent pathways." *Cell Microbiol* **11**(11): 1624-1637.
- Zhang, Y. Y., B. H. Zhang, et al. (2003). "Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(21): 12372-12377.
- Zheng, D. L., L. Zhang, et al. (2009). "Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A." *J Hepatol* **50**(2): 377-387.
- Zheng, P. Y., D. Y. Zhang, et al. (2007). "Effects of lamivudine on the function of dendritic cells derived from patients with chronic hepatitis B virus infection." *World J Gastroenterol* **13**(34): 4641-4645.
- Zheng, Y. W., J. Riegler, et al. (1994). "Novel short transcripts of hepatitis B virus X gene derived from intragenic promoter." *J Biol Chem* **269**(36): 22593-22598.
- Zhou, D. X. and T. S. Yen (1991). "The hepatitis B virus S promoter comprises A CCAAT motif and two initiation regions." *J Biol Chem* **266**(34): 23416-23421.
- Zhou, S., A. M. Cerny, et al. (2010). "Discovery of a novel TLR2 signaling inhibitor with anti-viral activity." *Antiviral Res* **87**(3): 295-306.
- Zhu, Y. Z., R. Zhu, et al. (2010). "Hepatitis B virus X protein promotes hypermethylation of p16(INK4A) promoter through upregulation of DNA methyltransferases in hepatocarcinogenesis." *Exp Mol Pathol* **89**(3): 268-275.

- Zlotnick, A., N. Cheng, et al. (1996). "Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein." *Biochemistry* **35**(23): 7412-7421.
- Zlotnick, A., J. M. Johnson, et al. (1999). "A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly." *Biochemistry* **38**(44): 14644-14652.
- Zlotnick, A., J. Z. Porterfield, et al. (2013). "To build a virus on a nucleic acid substrate." *Biophys J* **104**(7): 1595-1604.
- Zoulim, F. (2011). "Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going?" *Liver Int* **31 Suppl 1**: 111-116.
- Zoulim, F. and S. Locarnini (2009). "Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues." *Gastroenterology* **137**(5): 1593-1608 e1591-1592.
- Zoulim, F. and S. Locarnini (2012). "Management of treatment failure in chronic hepatitis B." *J Hepatol* **56 Suppl 1**: S112-122.
- Zoulim, F. and S. Locarnini (2013). "Optimal management of chronic hepatitis B patients with treatment failure and antiviral drug resistance." *Liver Int* **33 Suppl 1**: 116-124.
- Zoulim, F., J. Saputelli, et al. (1994). "Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo." *J Virol* **68**(3): 2026-2030.
- Zoulim, F. and C. Seeger (1994). "Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase." *J Virol* **68**(1): 6-13.





# **RESUME DE LA THESE**

L'infection chronique par le virus de l'hépatite B (HBV) demeure encore un réel problème de santé publique avec environ 350 millions de porteurs chroniques dans le monde, ayant un risque accru de développer de graves complications hépatiques telles qu'une cirrhose décompensée et/ou un hépatocarcinome. Les traitements actuels à base d'IFN et d'analogues de nucléos(t)ides ne permettent pas d'éradiquer complètement l'infection du fait de la persistance de l'ADNccc et des phénomènes de résistance observés chez les patients. S'agissant des traitements par IFN, 70% des patients porteurs chroniques sont non-répondeurs. Cette résistance aux traitements exogènes par IFN est une des preuves indirectes que le virus HBV a développé des stratégies immunosuppressives pour établir et maintenir à très long terme (des décades) une infection persistante. En effet, d'après des données cliniques et expérimentales, aucune réponse immune n'est détectée durant la phase d'expansion logarithmique du virus HBV et pendant la première phase de l'infection chronique, dite « d'immunotolérance ». La compréhension des mécanismes impliqués dans cette viro-immunosuppression devient ainsi un enjeu majeur dans la mise en place de nouvelles stratégies antivirales. En effet, le réveil du système immunitaire, par une intervention thérapeutique visant à lever les blocages viro-induit pendant cette phase d'immunotolérance, pourrait en effet permettre de mieux combattre l'infection HBV, à l'instar de ce qu'il se passe pendant la guérison de l'infection en phase aigue.

Ainsi, les objectifs de ma thèse ont consisté en l'étude des relations précoces entre HBV et les hépatocytes, et ceci dans des modèles d'infection pertinents tels que les cellules HepaRG et les hépatocytes primaires humains (PHH). Nous avons tout d'abord pu mettre en évidence que cette absence d'activation du système immunitaire était en fait le résultat, non pas d'une « invisibilité » du virus, mais d'une inhibition active, et précocement établie par le virus HBV pour établir une infection persistante. Cette inhibition des réponses IFN de type I/III et proinflammatoires était portée par les composants viraux déjà présents dans l'inoculum (AgHBs, AgHBe et particules infectieuses), et donc indépendante de la réplication virale, ce qui pouvait dès lors expliquer sa précocité. De façon intéressante, nous avons pu mettre en évidence que seules les particules infectieuses étaient capable de contrecarrer l'activation des réponses IFN. Nous nous sommes ainsi intéressés plus particulièrement à la protéine de capside (ou HBc), composante majoritaire de la nucléocapside virale. Nous avons pu démontrer que la protéine HBc présente dans les virions était capable d'inhiber spécifiquement l'activation des voies IFN de type I et III, ainsi que l'expression des ISGs. Plus particulièrement, nous avons pu mettre en évidence que son mécanisme moléculaire d'action au niveau nucléaire impliquait l'interaction de la protéine HBc avec les promoteurs des gènes de l'immunité innée, le recrutement de méthyl-transférases des histones, et l'installation de marques épigénétiques (H3K9me2/3) répressives sur ces gènes.

Ces résultats prônent finalement l'utilisation de nouvelles stratégies antivirales utilisant d'une part des anticapsides pouvant induire la dégradation ou le mis-assemblage de la protéine HBc, et/ou prévenir sa localisation nucléaire, restaurant ainsi le potentiel immunitaire des hépatocytes chez les patients porteurs chroniques. Cette thérapie pourrait également être couplée avec des stimulations de l'immunité innée *via* les agonistes de PRRs, permettant *in fine* d'exacerber la réponse immunitaire pour contrôler l'infection HBV.